

---

---

**Generierung und Analyse  
von konditionalen Mausmutanten  
zur Untersuchung der Interaktionen  
von  $\beta_7$ -Integrin und MAdCAM-1**

---

---

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Annika Kochut  
aus Salzgitter

1. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland

2. Referent: Prof. Dr. Stefan Dübel

eingereicht am: 26.03.2008

mündliche Prüfung (Disputation) am: 02.07.2008

Druckjahr 2008

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeiträge**

#### **Kochut A., Müller W., Schippers A.**

Generation and analysis of mice with mutations in the  $\beta_7$ -Integrin gene.

ENII – Mugen Immunology Summer School, Sardinien, Capo Caccia, Mai 2006

#### **Kochut A., Müller W., Schippers A.**

Generation and analysis of mice with mutations in the  $\beta_7$ -Integrin gene.

Annual Meeting of the Biochemical Society, Manchester, Großbritannien, Dezember 2007

**Schippers A., Leuker C., Pabst O., Kochut A., Gruber A.D., Wagner N., Müller W.** Generation and analysis of a mouse mutant deficient for the adhesion molecule MAdCAM-1. Annual Meeting of the Biochemical Society, Manchester, Großbritannien, Dezember 2007

**Schippers A., Leuker C., Pabst O., Kochut A., Gruber A.D., Müller W., Wagner N.** Generation and analysis of a mouse mutant deficient for the adhesion molecule MAdCAM-1. Keystone Symposia – Leukocyte Trafficking, Keystone, Colorado, USA, Januar 2008

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Allgemeine Einleitung</b>	<b>1</b>
1.2.1	Migration und Adhäsion im Immunsystem	3
<b>1.3</b>	<b>Homing</b>	<b>4</b>
1.3.1	Die leukozytäre Adhäsions- und Transmigrationskaskade	4
	Initiale Adhäsion von Leukozyten und Rollen entlang des Endothels	5
	Aktivierung von Integrinen und Adhäsion von Leukozyten	6
	Transmigration der Leukozyten	8
1.3.2	Homing von naiven T- und B-Zellen	9
1.3.3	Migration von immunkompetenten Lymphozyten	10
	Homing von Effektor/Gedächtnis T-Zellen	10
	Gewebsspezifische Homing-Rezeptoren	10
	Homing von Antikörper-sezernierenden Zellen (ASC)	12
	Gerichtetes homing von Lymphozyten: Darm versus Haut	13
<b>1.4</b>	<b>Bedeutung der homing-Rezeptoren MAdCAM-1 und <math>\alpha_4\beta_7</math>-Integrin</b>	<b>14</b>
1.4.1	MAdCAM-1	15
1.4.2	Integrine	16
	Allgemeine Einleitung zu Integrinen	16
	Affinitätsregulierung von Integrinen durch inside-out signalling	19
	Signaltransduktion durch Integrine (outside-in signalling)	21
	Die zytoplasmatischen Domänen der Integrine	23
1.4.3	$\beta_7$ -Integrine	26
	Regulierung der Avidität des $\alpha_4\beta_7$ -Integrins durch die $\beta_7$ zytoplasmatische Domäne	27
	Phänotyp der $\beta_7$ -Integrin defizienten Maus	29
<b>1.5</b>	<b>Aufgabenstellung und Zielsetzung</b>	<b>30</b>
	A: Einführung von spezifischen Mutationen in die zytoplasmatische Domäne des $\beta_7$ -Integrins	30
	B: Analyse der MAdCAM-1 defizienten Maus	32
<b>2</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>33</b>
<b>2.1</b>	<b>Generierung von Mausmutanten mit gezielten Veränderungen in der zytoplasmatischen Domäne des <math>\beta_7</math>-Integrin Gens</b>	<b>34</b>
2.1.1	Umkonstruktion des Targeting Vektors mit der Mutation $\Delta 61$	36
2.1.2	Transfektion der Targeting Vektoren in murine embryonale Stammzellen und Detektion von homologer Rekombination mittels Southern Blot und PCR	39
2.1.3	Flp Rekombinase-vermittelte <i>in vitro</i> Deletion des Neomycin-Resistenzgens	41
2.1.4	Generierung von Mausmutanten mit spezifischen Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne des $\beta_7$ -Integrins	43
<b>2.2</b>	<b>Analyse von Mausmutanten mit gezielten Veränderungen im <math>\beta_7</math>-Integrin Gen</b>	<b>47</b>
2.2.1	Analyse der Expression von $\beta_7$ -Integrin auf Lymphozyten der Mausmutanten	47
2.2.2	Analyse der $\alpha_E\beta_7$ -Integrin Expression auf Lymphozyten der Mausmutanten	53
2.2.3	Histologische Analyse der Peyer'schen Platten von $\Delta 34$ und D-R Mutanten	55
2.2.4	Größenbestimmung der Peyer'schen Platten von $\Delta 34$ und D-R Mutanten	58

<b>2.3 Analyse der MAdCAM-1 defizienten Mausmutante</b>	<b>59</b>
2.3.1 Gene targeting von MAdCAM-1	59
2.3.2 Histologische Analyse der Peyer`schen Platten von adulten MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ Mutanten	60
2.3.3 Größenbestimmung der Peyer`schen Platten von MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ Mutanten	61
2.3.4 Quantifizierung von IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria von MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ Mutanten	62
2.3.5 Analyse des Migrationsverhaltens von T-Lymphozyten in MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ Mutanten	65
2.3.6 Analyse des Migrationsverhaltens von immunkompetenten T-Effektorzellen in MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ Mutanten	67
2.3.7 Analyse der humoralen Immunantwort in MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ und $\beta_7$ -Integrin $\Delta/\Delta$ Mutanten	69
<b>3 DISKUSSION UND AUSBLICK</b>	<b>72</b>
<b>3.1 Generierung von Mausmutanten mit gezielten Veränderungen im <math>\beta_7</math>-Integrin Gen</b>	<b>72</b>
3.1.1 Umkonstruktion des <i>Targeting</i> Vektors mit der Mutation $\Delta 61$ für die Verhinderung von NMD	72
3.1.2 Etablierung der Mutationen $\Delta 61$ , $\Delta 34$ , D-R und Y-A in ES-Zellen	74
3.1.3 Generierung von Mausmutanten mit den Mutationen $\Delta 34$ , $\Delta 61$ sowie D-R in der zytoplasmatischen Domäne des $\beta_7$ -Integrin Gens	75
<b>3.2 Phänotypische Analyse der Auswirkungen der Mutationen <math>\Delta 34</math>, D-R und <math>\Delta 61</math> in Lymphozyten</b>	<b>75</b>
3.2.1 Expressionsanalyse von $\beta_7$ -Integrin sowie $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf Lymphozyten von $\Delta 34$ , D-R und $\Delta 61$ Mausmutanten	76
Reduktion der $\beta_7$ -Integrin und $\alpha_E\beta_7$ -Integrin Expression auf Lymphozyten von $\Delta 34$ B11 Mutanten	76
Normale Expression des $\beta_7$ -Integrins auf Lymphozyten von $\Delta 34$ G5 Mutanten	77
Deutliche Reduktion der $\beta_7$ -Integrin und $\alpha_E\beta_7$ -Integrin Expression auf Lymphozyten von D-R Mutanten	78
Kompletter Verlust der $\beta_7$ -Integrin sowie $\alpha_E\beta_7$ -Integrin Expression auf Lymphozyten der $\Delta 61$ Mutanten	80
3.2.2 Qualitative und quantitative Analyse der Peyer`schen Platten von $\Delta 34$ , D-R und $\Delta 61$ Mutanten	81
3.2.3 Ausblick	83
<b>3.3 Analyse der MAdCAM-1 defizienten Mausmutante</b>	<b>84</b>
3.3.1 MAdCAM-1 beeinflusst den Aufbau und die Größe der Peyer`schen Platten	85
3.3.2 Drastische Reduktion der IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria von MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ Mutanten	86
3.3.3 Die humorale IgA-Immunantwort ist abhängig von MAdCAM-1 / $\beta_7$ -Integrin Interaktionen	87
3.3.4 Die Migration von Lymphozyten in MLNs ist abhängig von MAdCAM-1 / $\beta_7$ -Integrin Interaktionen	88
3.3.5 Das homing von immunkompetenten T-Effektorzellen in die Lamina Propria des Dünndarms ist abhängig von MAdCAM-1 Wechselwirkungen	89
3.3.6 Ausblick	90
<b>4 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>92</b>

<b>5 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>94</b>
<b>5.1 Chemikalien allgemein</b>	<b>94</b>
<b>5.2 Material für die Zellkultur</b>	<b>94</b>
<b>5.3 Verwendete Zelllinien</b>	<b>94</b>
5.3.1 Murine embryonale Feederzellen (EF-Zellen) mit Neomycinresistenz	94
5.3.2 Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen)	94
<b>5.4 Medien für murine embryonale Stammzellen</b>	<b>95</b>
5.4.1 EF-Medium	95
5.4.2 ES-Medium	95
5.4.3 Einfriermedium (2x)	95
<b>5.5 Methoden in der Zellkultur</b>	<b>95</b>
5.5.1 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen	95
5.5.2 Splitten und Expandieren von ES-Zellen	95
5.5.3 Zellzahlbestimmung	96
5.5.4 Stabile Transfektion von ES-Zellen mit den Targeting Vektoren	96
5.5.5 Isolierung von Klonen	96
5.5.6 Einfrieren von ES-Zellklonen in 96-Loch-Platten	97
5.5.7 Revitalisierung von ES-Zellklonen in 96-Loch-Platten	97
5.5.8 Transiente Transfektion von ES-Zellen mit dem Flp-Plasmid	97
5.5.9 Zelllyse von ES-Zellklonen und anschließende DNA-Gewinnung	98
<b>5.6 Molekularbiologische Standardmethoden</b>	<b>99</b>
5.6.1 Verwendete Lösungen, Puffer und Medien	99
5.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	100
5.6.3 Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen	100
5.6.4 Agarosegelelektrophorese	100
5.6.5 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel	100
5.6.6 Restriktionsspaltungen	101
5.6.7 Ligation und Klonierung von DNA-Fragmenten	101
5.6.8 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien	101
5.6.9 Isolierung von DNA-Sonden	101
5.6.10 Southern Blot und Hybridisierung	101
5.6.11 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	102
5.6.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	102
5.6.13 Umklonierung des Targeting Vektors $\Delta 61$	104
<b>5.7 Isolierung von primären murinen Zellen</b>	<b>104</b>
5.7.1 Verwendete Mauslinien	104
5.7.2 Verwendete Lösungen, Puffer und Medien	105
5.7.3 Isolierung von Milzzellen	106
5.7.4 Isolierung von Lymphozyten aus Blut für die FACS-Analyse	106
5.7.5 Entnahme von Blut für die Gewinnung von Serum	107
5.7.6 Aufarbeitung von Fäzes	107
5.7.7 Isolierung von Zellen der MLNs, PLNs und PPs	107
5.7.8 Isolierung intestinaler Lymphozyten: IELs und LPLs	107

---

<b>5.8 Arbeiten mit primären murinen Zellen</b>	<b>108</b>
5.8.1 Durchflusszytometrie	108
5.8.2 Verwendete Antikörper in der FACS-Analyse	109
5.8.3 Elispot-Assay	109
5.8.4 `Short-term` Migrationsassay	111
5.8.5 Adoptive Transferexperimente	112
<b>5.9 ELISA</b>	<b>113</b>
<b>5.10 Histologische Untersuchungen</b>	<b>113</b>
5.10.1 Verwendete Antikörper in der Histologie	113
5.10.2 Entnahme und Aufarbeitung von Organen für Parafinschnitte	113
5.10.3 Entnahme und Aufarbeitung von Organen für Kryoschnitte	114
5.10.4 Anfertigung von Kryoschnitten und Immunhistochemie	114
5.10.5 Färbung von lymphatischen Geweben mit Chicago Sky Blue	114
<b>5.11 Statistische Auswertungen</b>	<b>115</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>116</b>
<b>7 ANHANG</b>	<b>125</b>
7.1 Primersequenzen	125
7.2 Matrizen für PCRs	126
7.3 Abkürzungsverzeichnis	128

# 1 Einleitung

## 1.1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist die Erzeugung und Analyse von konditionalen Mausmutanten zur Aufklärung der Funktion immunologischer Abwehrmechanismen und den daran beteiligten spezifischen Adhäsionsmolekülen.

## 1.2 Allgemeine Einleitung

Das Immunsystem stellt ein komplexes Netzwerk von verschiedenen Molekülen, Zelltypen und Geweben dar, dessen Aufgabe darin besteht, den Körper vor eindringenden Mikroorganismen zu schützen. Es ist in der Lage eingedrungene Krankheitserreger oder fremde Substanzen zu entfernen und kann außerdem krankhaft veränderte körpereigene Zellen zerstören. Die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Mikroorganismen ist die angeborene Immunantwort. Dieser unspezifische Abwehrmechanismus hat die Aufgabe, eine Infektion während der ersten Tage, die bis zum Einsetzen der adaptiven (erworbenen) Immunantwort vergehen, in Schach zu halten. Die Aufgaben der angeborenen Immunabwehr werden von verschiedenen Zelltypen, wie Makrophagen, natürlichen Killerzellen und Granulozyten wahrgenommen. Diese Zellen sind in der Lage Pathogene oder infizierte Zellen zu erkennen und zu vernichten. Außerdem können diese Zellen Zytokine produzieren, die wiederum die Immunantwort stärken, indem andere Zellen des Immunsystems aktiviert werden. Einen weiteren wichtigen Bestandteil des Immunsystems bilden die Zytokine und Chemokine. Es handelt sich hierbei um Proteine, die von verschiedenen Zellen sezerniert werden und als Signal- und Aktivierungsmoleküle wirken. Zytokine, wie die Interferone oder Interleukine, steuern die Kommunikation zwischen Zellen des Immunsystems und wirken immunstimulierend, indem sie z.B. eine antivirale Wirkung haben. Bei den Chemokinen handelt es sich um chemotaktisch wirkende Zytokine, die von vielen Zelltypen sezerniert werden und Leukozyten anlocken und aktivieren können. Das Komplementsystem stellt eine weitere Gruppe von Proteinen des Immunsystems dar. Es handelt sich hierbei um Plasmaproteine, die miteinander reagieren, um Krankheitserreger zu opsonisieren und eine Reihe von Entzündungsreaktionen auszulösen, die den Kampf gegen eine Infektion unterstützen.

Ein Hauptmerkmal des Immunsystems ist die Fähigkeit jedes beliebig fremde Antigen zu erkennen, man spricht hier vom adaptiven Immunsystem. Diese spezifische Abwehr reagiert mit einer für jedes Pathogen angepassten Immunantwort und führt zu dem sogenannten immunologischen Gedächtnis. Ein weiteres Hauptmerkmal ist die Fähigkeit zwischen körpereigenen und fremden Zellen zu unterscheiden. Diese Selbsttoleranz gegenüber körpereigenem Gewebe wird durch klonale Deletion oder Inaktivierung von



heranreifenden Lymphozyten erreicht. Eine Störung dieser Selbsttoleranz, d.h. wenn der Organismus irrtümlicherweise körpereigenes Gewebe als zu bekämpfenden Fremdkörper erkennt, führt zu sogenannten Autoimmunerkrankungen, wie einigen Formen der Diabetes oder Arthritis.

Lymphatische Organe sind überall im Körper zu finden. Sie beherbergen die Lymphozyten, welche die Schlüsselfiguren im Immunsystem darstellen. Alle Zellen des Immunsystems sind hämatopoietischen Ursprungs und werden im Knochenmark gebildet. T-Lymphozyten, oder kurz T-Zellen, reifen im Thymus heran, einem zentralen lymphatischen Organ im oberen Brustbereich. So wie B-Zellen, sind T-Zellen Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Alle T-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche den T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor* - TCR), der für die Erkennung von zellgebundenen Antigenen verantwortlich ist. Es werden mehrere Subtypen von T-Zellen unterschieden, die unterschiedliche Funktionen im Immunsystem einnehmen. T<sub>H</sub>-Zellen (T-Helferzellen) tragen den CD4-Rezeptor auf ihrer Oberfläche und erkennen Antigene, die ihnen von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells* - APCs) auf MHC-Rezeptoren dargeboten werden. Während T<sub>H</sub>1-Zellen z.B. Makrophagen aktivieren und Zytokine freisetzen können, aktivieren T<sub>H</sub>2-Zellen die Produktion von Antikörpern durch B-Lymphozyten (humorale Immunantwort). Eine andere Klasse von T-Lymphozyten, die zytotoxischen T-Zellen, exprimieren das CD8-Molekül auf ihrer Oberfläche und können direkt mit Viren infizierte Zellen erkennen und in den programmierten Zelltod treiben. Aus diesen Beispielen wird deutlich, dass T-Zellen sowohl für die humorale als auch für die zellvermittelte adaptive Immunantwort von entscheidender Bedeutung sind.

B-Lymphozyten sind als einzige Zellen des Immunsystems in der Lage Antikörper zu produzieren und machen zusammen mit den T-Zellen den entscheidenden Bestandteil des adaptiven Immunsystems aus. Werden B-Zellen durch körperfremde Antigene aktiviert, differenzieren sie zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder Gedächtniszellen und sind somit Träger der humoralen Immunantwort. Naive B-Zellen (reife B-Zellen, die noch keinen Kontakt zu ihrem Antigen hatten) zirkulieren im Blut und den lymphatischen Organen des Körpers von Wirbeltieren. Sobald eine B-Zelle mit ihrem B-Zell-Rezeptor an ein fremdes Antigen bindet und gleichzeitig ein kostimulierendes Signal von T<sub>H</sub>-Zellen bekommt, wandert sie zu den Keimzentren in Lymphknoten oder Milz. Hier teilt sie sich stark, differenziert zur Plasmazelle und sezerniert anschließend Antikörper, die ins Blut abgegeben werden. Diese Antikörper besitzen dieselbe Spezifität wie der B-Zell-Rezeptor der Zelle, das heißt, sie binden an dasselbe Antigen. Die von B- und T-Zellen beschriebenen Abwehrmechanismen, wie die Bildung von Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder Gedächtniszellen, sind die Träger der gezielten adaptiven Immunantwort.

### 1.2.1 Migration und Adhäsion im Immunsystem

Zellmigration und -adhäsion spielen eine zentrale Rolle sowohl in normalen Prozessen, wie der Embryonalentwicklung und Wundheilung als auch bei pathologischen Vorgängen wie z.B. der Tumorgenese oder Entzündung.

In adulten Organismen ist die Beweglichkeit der einzelnen Zellen des Immunsystems ein unabdingbarer Bestandteil der Infektionsabwehr, der Reifung von verschiedenen Leukozyten sowie der Aufrechterhaltung der immunologischen Überwachung durch die verschiedenen Zellen. Lymphozyten können mit Hilfe des Blutes oder der Lymphe in alle Abschnitte des Körpers gelangen.

Sowohl für die angeborene als auch adaptive Immunantwort spielen Migration und Adhäsion wesentliche Rollen. Zu den induzierten Reaktionen des angeborenen Immunsystems gehört die gerichtete Chemotaxis, hervorgerufen durch Chemokine. Diese löslichen Proteine, die u.A. von Phagozyten sezerniert werden, wirken als Lockstoffe, indem sie Leukozyten, Monozyten, neutrophile Zellen und andere Effektorzellen aus dem Blut zu den Infektionsherden leiten. Sie veranlassen die Zellen in das umgebende Gewebe einzuwandern und können außerdem die Rollbewegungen von Leukozyten am Endothel in eine stabile Bindung umwandeln, indem sie Konformationsänderungen bei den beteiligten Adhäsionsmolekülen verursachen.

Auch bei der Reifung von B- und T-Zellen spielt die Migration eine wesentliche Rolle. Heranreifende Zellen der B-Zell-Linie wandern innerhalb des Knochenmarks, wobei sie aber immer durch spezielle Adhäsionsmoleküle mit den nicht-lymphatischen Stromazellen in Kontakt stehen. B-Zellen sind während ihrer Entwicklung im Knochenmark auf Stromazellen angewiesen. Um jedoch ihre vollständige Reife zu erlangen, müssen B-Zellen in periphere Lymphorgane, wie die Milz einwandern, um dort die Endstadien ihrer Entwicklung durchlaufen zu können. Ähnlich verhält es sich mit T-Lymphozyten: T-Vorläuferzellen stammen ebenfalls aus dem Knochenmark, ihre endgültige Entwicklung findet jedoch im Thymus statt. Zur vollständigen Reifung müssen also auch diese Zellen aus dem Knochenmark in den Thymus wandern. Das weitere Heranreifen und Überleben der Lymphozyten findet in den peripheren lymphatischen Geweben statt. Hierbei handelt es sich um organisierte Strukturen mit unterschiedlichen Bereichen für B- und T-Zellen. Beispiele für periphere oder sekundäre lymphatische Organe sind die Milz, die Lymphknoten oder das darmassoziierte lymphatische Gewebe (*gut associated lymphoid tissue* - GALT). Diese Organe sind darauf spezialisiert, die Einleitung von adaptiven Immunantworten zu ermöglichen, indem Antigene eingefangen und diese den zirkulierenden Lymphozyten durch APCs präsentiert werden. Sobald die Lymphozyten die zentralen Lymphgewebe verlassen haben, transportiert der Blutstrom sie also zu diesen peripheren lymphatischen Organen. Trifft ein Lymphozyt in einem dieser Gewebe nicht

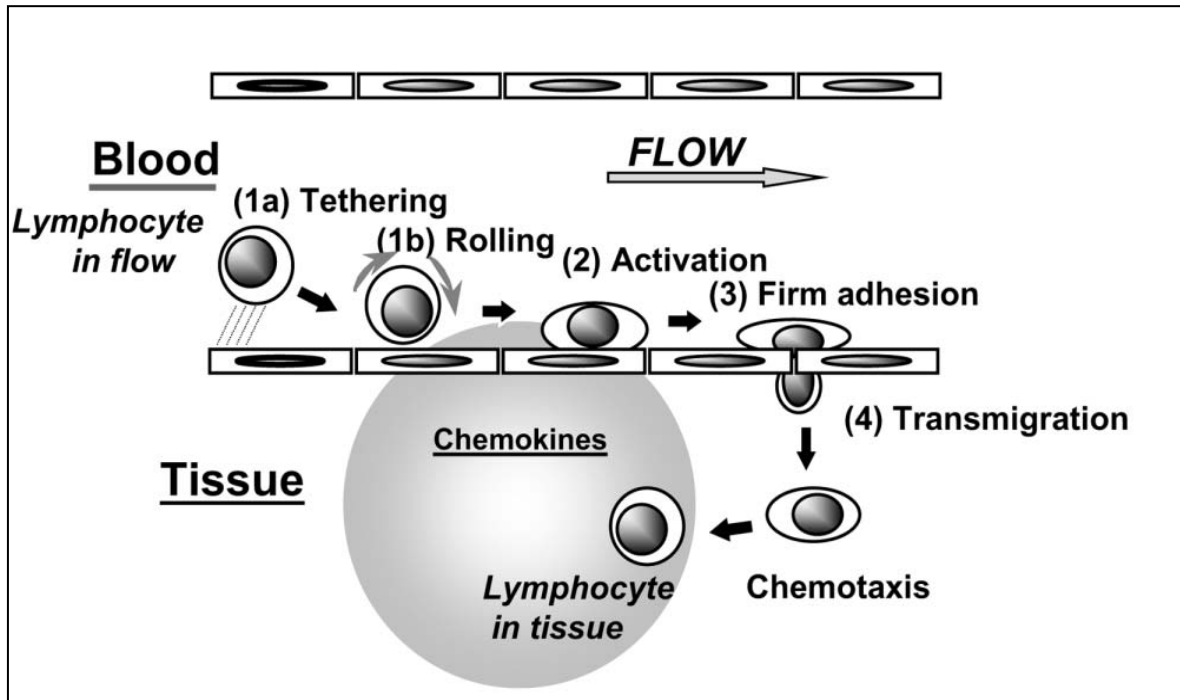
auf sein spezifisches Antigen und wird somit nicht aktiviert, verlässt er das Gewebe und wird erneut durch Lymphe und Blut transportiert. Neu gebildete Lymphozyten gelangen auch mit dem Blut in die Lymphknoten. Dabei treten sie durch die Wände von Venolen mit hohem Endothel (*high endothelial venules* - HEVs). Dieser Prozess, bei dem Leukozyten die Blutgefäßwand durchqueren, indem sie sich zwischen den Endothelzellen hindurchdrücken wird als Extravasation bezeichnet. Er wird von speziellen Adhäsionsmolekülen vermittelt, deren Expression an der Oberfläche der beteiligten Leukozyten und des lokalen Blutgefäßendothels induziert wird. HEVs sind in den T-Zell-Zonen angesiedelt; naive B-Zellen wandern durch den T-Zell-Bereich zum Follikel, in dem sie etwa einen Tag bleiben, wenn sie nicht auf ihr spezifisches Antigen treffen und aktiviert werden. B- und T-Zellen verlassen den Lymphknoten schließlich mit der Lymphe über das *Vas efferens* das sie zum Blut zurückführt.

Für die Bekämpfung von in den Körper gelangten Mikroorganismen oder Pathogenen ist es von entscheidender Bedeutung, dass Leukozyten sowohl des angeborenen als auch erworbenen Immunsystems in der Lage sind, aus dem Blutgefäßsystem in die infizierten Gewebe einzuwandern. Dabei stellt die Mobilisierung von aktivierten Phagozyten und neutrophilen Leukozyten zu den Infektionsherden eine der wichtigsten Funktionen der angeborenen Immunität dar. Jedoch auch die Rezirkulation von immunkompetenten Lymphozyten des erworbenen Immunsystems über die Blut- oder Lymphbahnen in sekundäre lymphatische Organe, um auf ihr spezielles Antigen zu treffen, hat die Extravasation zur Grundlage, die nun im Folgenden näher beschrieben werden soll.

### 1.3 *Homing*

#### 1.3.1 Die leukozytäre Adhäsions- und Transmigrationskaskade

Die Rekrutierung von Leukozyten vom Blut in die umliegenden Gewebe ist unentbehrlich für die Entwicklung einer Immunantwort nach einer Infektion oder Verletzung. Es handelt sich hierbei um einen sehr dynamischen, mehrstufigen Prozess, in dem Leukozyten mit dem Endothel von postkapillaren Venolen interagieren. Diese Kaskade, in der die im Blutstrom flottierenden Leukozyten transiente molekulare Interaktionen mit den Endothelzellen der Gefäßwand eingehen, unterteilt sich in vier sequentielle Abschnitte und wurde bereits 1991 von Butcher und Kollegen [1] in einem Modell zusammengefasst. Abb. 1.1 zeigt schematisch den Verlauf dieser Kaskade.



**Abb. 1.1: Vereinfachte Darstellung der Extravasation von Leukozyten:** Die initiale Adhäsion (1a) und das Rollen (1b) entlang des Endothels wird durch die transiente Interaktion von Selektinen und ihren Liganden, sowie Integrinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie vermittelt. Die feste Adhäsion (3) erlaubt die Transmigration (4) der Leukozyten in das darunterliegende Gewebe. Tethering – Initiale Adhäsion, Rolling – Rollen entlang des Endothels, Activation – Aktivierung, Firm adhesion – Feste Adhäsion, Transmigration – Transmigration oder Extravasation (nach Sackstein, [2] )

Alle Schritte in dieser Kaskade werden von unterschiedlichen Zelladhäsionsmolekülen (cell adhesion molecules - CAMs) vermittelt, die sowohl auf den Leukozyten als auch auf dem Endothel exprimiert werden und verschiedene CAMs sind dabei für die unterschiedlichen Schritte der Kaskade verantwortlich [3]. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Schritte der Extravasation mit den beteiligten Molekülen vorgestellt.

### **Initiale Adhäsion von Leukozyten und Rollen entlang des Endothels**

Die erste molekulare Bindung von Leukozyten an das Endothel (*Tethering*), sowie das Rollen entlang des Endothels wird durch Selektine und deren Liganden vermittelt. Selektine sind eine Familie von calciumabhängigen Typ I Transmembran-Glykoproteinen, und die drei bisher bekannten Mitglieder E-Selektin, P-Selektin und L-Selektin wurden nach den Zelltypen benannt, in denen sie ursprünglich identifiziert wurden (Endothel, Blutplättchen, Leukozyten).

P-Selektin (CD62P) wird konstitutiv exprimiert und in intrazellulären  $\alpha$ -Granula (in Blutplättchen) oder Weibel-Palade-Körpern (im Endothel) gespeichert. Wird das Endothel durch Entzündungs-Mediatoren stimuliert (wie Thrombin, Histamin oder LPS), erfolgt die Expression von P-Selektin an der Zelloberfläche, indem die Granula mit der

Plasmamembran verschmelzen [4]. Daher ist P-Selektin an der frühen Phase der Leukozyten-Rekrutierung während einer Immunantwort beteiligt [5].

E-Selektin (CD62E) wird *de novo* synthetisiert und mit Hilfe von Mediatoren, wie IL-1, LPS oder TNF- $\alpha$ , auf dem Endothel exprimiert. Die Expression von E-Selektin auf dem Endothel resultiert in einer deutlichen Abnahme der Rollgeschwindigkeit der Leukozyten, was die anschließende Adhäsion an das Endothel ermöglicht und erleichtert [6].

Das dritte Mitglied dieser Familie, L-Selektin (CD62L), wurde ursprünglich als *homing*-Molekül identifiziert und wird auf Leukozyten exprimiert. Es ist das einzige Selektin, welches die Rekrutierung von Lymphozyten auf Venolen mit hohem Endothel in lymphatischen Geweben vermittelt [7]. Deutlich wird diese Eigenschaft in L-Selektin defizienten Mäusen, die eine signifikante Abnahme im *homing* der Lymphozyten zu den HEVs der Peyer'schen Platten (*Peyer's patches* – PPs) aufweisen [8].

Als Liganden der Selektine dienen Mitglieder der Sialomuzinfamilie und alle Selektine erkennen das Tetrasaccharid Sialyl Lewis<sup>x</sup>. Der am besten charakterisierte Ligand der Selektine ist PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*). Er wird auf myeloiden, lymphatischen und dendritischen Zellen (DCs) exprimiert und kann als Ligand für alle drei Selektine dienen [9]. Für L-Selektin wurden bisher mindestens vier Liganden identifiziert: GlyCAM-1 (*glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*), MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*), CD34 und Sgp200 [10]. Alle diese Moleküle werden auf HEVs in lymphatischen Geweben exprimiert und vermitteln das L-Selektin-abhängige Rollen. Zusätzlich zum Selektin-abhängigen Rollen entlang des Endothels sind die Integrine  $\alpha_4\beta_1$  (*very late antigen-4* – VLA-4) und  $\alpha_4\beta_7$  (*lymphocyte Peyer's patch HEV adhesion molecule-1* – LPAM-1) als einzige Mitglieder ihrer Familie in der Lage das Rollen der Lymphozyten *in vitro* und *in vivo* zu vermitteln [11] [12].

### **Aktivierung von Integrinen und Adhäsion von Leukozyten**

Die feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel als Voraussetzung für die anschließende Migration in das darunterliegende Gewebe wird hauptsächlich durch Mitglieder der Integrin-Familie vermittelt.

Im Gegensatz zu Selektinen, die konstitutiv aktiv sind, müssen Integrine für die Vermittlung der Adhäsion aktiviert werden. Bei den Integrinen handelt es sich um transmembrane, heterodimere Glykoproteine, die sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammensetzen (siehe Abschnitt 1.4.2). Integrine sind allosterische Proteine, die in einer aktiven und inaktiven Konformation vorliegen können. Die Aktivierung der Integrine für die Adhäsion an das Endothel erfolgt durch die Bindung von Chemokinen. Wie schon erwähnt sind Chemokine von verschiedenen Zelltypen sezernierte Proteine, die an ihre zugehörigen Rezeptoren auf Leukozyten binden und

über G-Proteine Signale weiterleiten. Außerdem können Chemokine Komponenten der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix* – ECM) binden, um immobilisiert zu werden und Leukozyten präsentiert zu werden. Durch die Bindung der Chemokine werden die Integrine auf den entsprechenden Leukozyten aktiviert [13].

Die Adhäsion von neutrophilen Zellen an das Endothel wird durch  $\beta_2$ -Integrine ermöglicht (*leukocyte function-associated molecule-1* – LFA-1 [ $\alpha_L:\beta_2$ ], Mac-1 [ $\alpha_M:\beta_2$ ], p150,95 [ $\alpha_X:\beta_2$ ] und  $\alpha_D:\beta_2$ ). LFA-1 wird praktisch auf allen Immunzellen exprimiert, wohingegen Mac-1 hauptsächlich auf myeloiden Zellen zu finden ist. Die zelluläre Verteilung von p150,95 und  $\alpha_D:\beta_2$  ist viel eingeschränkter, hauptsächlich findet man diese Integrine auf Makrophagen [14]. Ein weiteres für die Adhäsion benötigtes Integrin ist das  $\alpha_4$ -Integrin. Es kann Heterodimere bilden mit  $\beta_1$ -Integrin ( $\alpha_4:\beta_1$ ), welches man auf den meisten mononuklearen Zellen finden kann, sowie mit  $\beta_7$ -Integrin ( $\alpha_4:\beta_7$ ), das man hauptsächlich auf Lymphozyten findet, die in die intestinalen Gewebe rezirkulieren [15].

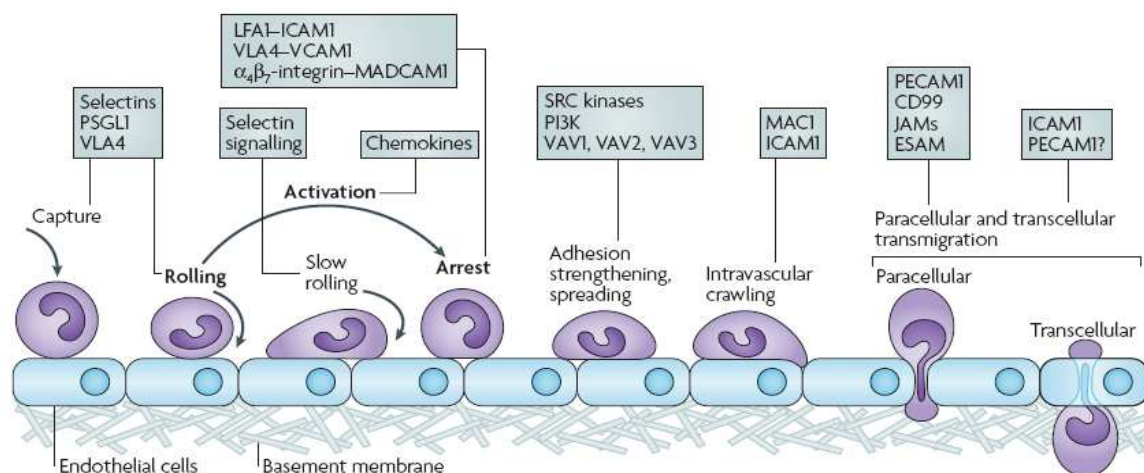
Nachdem die beteiligten Integrine durch Chemokine aktiviert wurden, muss eine stabile Bindung zum Endothel hergestellt werden, um die Auswanderung der Leukozyten aus dem Gefäß in die umliegenden Gewebe zu ermöglichen. Dies geschieht durch die Bindung der Integrine an ihre auf dem Endothel exprimierten Liganden. Hierbei handelt es sich um Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie), die sich aus einer unterschiedlichen Zahl von Immunglobulin-ähnlichen Domänen zusammensetzen und verschieden stark glykosyliert sind [16]. Die endothelialen Liganden für LFA-1 sind ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) sowie ICAM-2. Beide Proteine werden konstitutiv auf dem Endothel exprimiert, können aber durch Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-4, hochreguliert werden. Als Ligand für Mac-1 dient ebenfalls ICAM-1. VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) ist der Hauptligand für  $\alpha_4:\beta_1$ -Integrin und bindet schwach an  $\alpha_4:\beta_7$ -Integrin. VCAM-1 wird in den meisten Geweben nicht konstitutiv exprimiert, kann aber durch die Stimuli der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 *de novo* synthetisiert werden. Von Norman und Kollegen konnte 2003 gezeigt werden, dass die Blockierung von VCAM-1 mit Antikörpern in adulten Mäusen eine stark reduzierte Adhäsion und Einwanderung der Lymphozyten zur Folge hat [17]. MAdCAM-1, ein weiteres Mitglied der Ig-Superfamilie, ist der hauptsächliche Ligand für das bereits erwähnte Integrin  $\alpha_4:\beta_7$ . Dieses *homing*-Molekül wird vorwiegend auf intestinalem Endothel exprimiert und ist zuständig für die Rekrutierung von Lymphozyten in das darmassoziierte lymphatische Gewebe [18].



### Transmigration der Leukozyten

Die Extravasation, also die Einwanderung der Leukozyten in das darunterliegende Gewebe, ist gegenwärtig Gegenstand intensiver Forschungen. Zahlreiche Proteine, darunter PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), CD99, JAMs (*junctional adhesion molecules*) sowie endotheliale Cadherine (*vascular-endothelial cadherin* - VE-Cadherin) sind an dem Prozess der Transmigration beteiligt. PECAM-1 und CD99, sowie auch einige Mitglieder der JAMs werden sowohl von Endothelzellen als auch von Leukozyten exprimiert. JAM-Proteine sind zum einen über homophile Interaktionen an der leukozytären Transmigration beteiligt, zum anderen wurden für diese Gruppe aber auch Interaktionen mit den Integrinen LFA-1, Mac-1 und VLA-4 beschrieben [19]. VE-Cadherin, das überwiegend im Bereich der *adherens-junctions* der Endothelzellen exprimiert wird, hat vermutlich einen indirekten Einfluss. In Bereichen der leukozytären Transmigration wird die Expressionsdichte von VE-Cadherin vorübergehend herunterreguliert. Es konnte vielfach bewiesen werden, dass Leukozyten die Endothelschicht an den interzellulären Kontaktstellen (*tight junctions* oder *adherens-junctions*) durchwandern [20]. Alternativ konnte jedoch u.a. durch Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass Leukozyten mit Hilfe eines Membrankanals transzellulär die Endothelschicht durchwandern [21] [22]. Jedoch wird die transzelluläre Migration nur von einer Minderheit von Zellen (~ 5-20 %) beschritten [22], unter anderem im ZNS, sowie während verschiedener Entzündungsreaktionen [23] [20].

Abb. 1.2 zeigt zusammenfassend ein detailliertes Bild der Adhäsions- und Migrationskaskade mit allen beteiligten Molekülen.



**Abb. 1.2: Detaillierte Darstellung der Adhäsions- und Migrationskaskade von Leukozyten mit den beteiligten Molekülen (nach Ley et al. [24])**

### 1.3.2 *Homing* von naiven T- und B-Zellen

Auch wenn die dargestellte Kaskade für alle Leukozyten gilt, variieren die in den verschiedenen Schritten beteiligten Moleküle abhängig von der Leukozyten-Population, dem Gewebe und dem immunologischen Kontext. Im Folgenden soll nun das *homing* von naiven T- und B-Zellen mit den daran beteiligten Molekülen detaillierter vorgestellt werden. Naive Lymphozyten migrieren vorzugsweise zu sekundären lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten (*lymph nodes* - LN), Peyer'schen Platten (PPs) oder der Milz, um dort auf ihr spezifisches Antigen zu treffen und somit aktiviert zu werden. Naive T-Zellen exprimieren L-Selektin, welches es ihnen ermöglicht, auf HEVs von Lymphknoten (*peripheral lymph node* – PLN, *mesenteric lymph node* – MLN) oder PPs zu rollen [25] [26]. Venolen mit hohem Endothel in PLN und MLN exprimieren die als PNAd (*peripheral node addressin*) benannten L-Selektin-Liganden, bei denen es sich um sialysierte, sulfatisierte und fucosylierte Glykoproteine handelt [27]. Außerdem werden auf dem Endothel von LN und PPs die Chemokine CCL21/SLC und vermutlich auch CCL19/ELC exprimiert, welche den Chemokinrezeptor CCR7 auf naiven T- und B-Zellen, sowie auf zentralen Gedächtnis T-Zellen (*central memory T cells* - T<sub>CM</sub>) aktivieren [28]. CCR7 wiederum löst die Aktivierung von LFA-1 (und/oder  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin) auf Lymphozyten aus, was wiederum die Adhäsion der Zellen auf HEVs zur Folge hat [29]. Um zu PLNs zu migrieren verwenden naive B-Zellen und T<sub>CM</sub>-Zellen dieselben Signalmoleküle wie naive T-Zellen, jedoch können naive T-Zellen nicht zusätzlich den Chemokinrezeptor CXCR4 für die Integrin-Aktivierung benutzen. Außerdem kann das Chemokinrezeptorpaar CXCR5-CXCL13 B-Zell-*homing* unterstützen [30]. Daher sind B-Zellen und T<sub>CM</sub>-Zellen weniger abhängig von CCR7-Signalen als naive T-Zellen. Andererseits exprimieren naive B-Zellen ca. 50 % weniger L-Selektin als naive T-Zellen, was eine deutlich geringere *homing*-Effizienz zu den PLNs zur Folge hat [31]. Anders als in PLN, findet man auf dem hohen Endothel der PPs das Adressin MAdCAM-1 [32]. MAdCAM-1 kann sowohl mit L-Selektin als auch mit dem Integrin  $\alpha_4\beta_7$  interagieren [33] [34] und obwohl  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin nur in geringer Dichte auf naiven T-Zellen zu finden ist, spielt es eine wichtige Rolle für die Migration zu PPs und MLNs [25] [34] [35]. Expression von MAdCAM-1 auf den HEVs von PPs und MLN trägt zum Rollen und Adhären der Zellen in diesen Organen bei. Die feste Adhäsion von naiven T-Zellen auf HEVs der PPs wird durch LFA-1 und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin vermittelt, welche durch das Chemokinrezeptorpaar CCL21-CCR7 aktiviert werden [25] [29]. Naive B-Zellen verwenden ebenfalls L-Selektin und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, um mit dem Endothel der PPs zu interagieren, und für die Aktivierung der Integrine benutzen sie, wie in PLN, CXCR4, CXCR5 sowie CCR7 [28]. Einen Sonderfall stellen die HEVs der mesenterialen Lymphknoten (MLNs) dar: sie exprimieren ein Mosaik von sowohl PNAd und MAdCAM-1 [36] [32], und unterstützen so die Adhäsionskaskaden für PPs und PLNs.



### 1.3.3 Migration von immunkompetenten Lymphozyten

#### ***Homing von Effektor/Gedächtnis T-Zellen***

Finden naive T-Zellen ihr entsprechendes Antigen, gewöhnlich präsentiert von DCs, werden sie aktiviert, proliferieren und differenzieren zu Effektor oder Gedächtnis T-Zellen. Die migratorischen Eigenschaften von diesen Zellen unterscheiden sich stark von naiven T-Zellen. Insbesondere können Effektor und Gedächtnis T-Zellen viel besser in nicht-lymphatische Gewebe und zu Entzündungsstellen migrieren [37] [38]. Außerdem können Gedächtnis Zellen wiederum in zwei Kategorien eingeteilt werden, basierend auf verschiedenen migratorischen und funktionellen Charakteristika [39]. Zentrale Gedächtnis T-Zellen ( $T_{CM}$ ) exprimieren, wie naive T-Zellen, L-Selektin und CCR7 und migrieren zu sekundären Lymphorganen [40]. Außerdem können  $T_{CM}$ -Zellen bestimmte Signalmoleküle hochregulieren und haben eine hohe Expression von CXCR4, welches ihnen erlaubt effizient in Organe mit CXCL12-Expression zu migrieren (z.B. Knochenmark und PLN) [41] [42]. Aufgrund ihres *memory*-Status exprimieren sie IL-7R $\alpha$  und können schneller und energischer als naive T-Zellen auf ihr entsprechendes Antigen reagieren [43] [44].

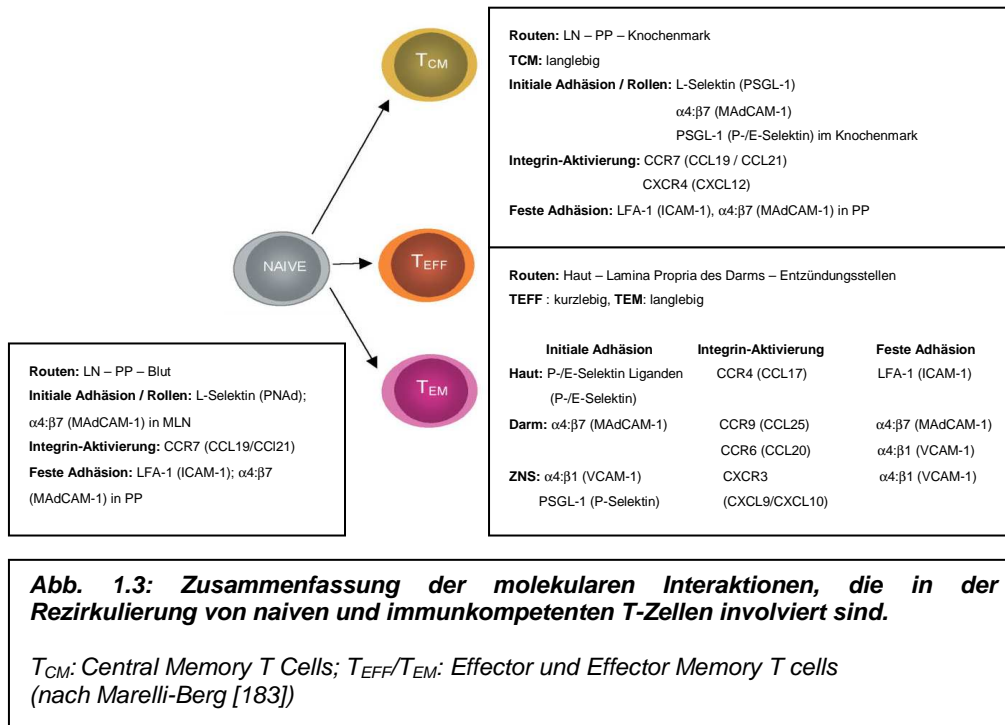
Im Gegensatz zu CCR7<sup>+</sup>  $T_{CM}$ -Zellen, exprimieren Effektor T-Zellen ( $T_{EFF}$ , kurzlebig) und Effektor-Gedächtnis T-Zellen ( $T_{EM}$ , langlebig, IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>) nicht CCR7 und die meisten sind zudem L-Selektin<sup>-</sup>. Daher sind diese Zellen nicht in der Lage effizient durch LN oder PPs zu rezirkulieren [39] [40]. Jedoch migrieren  $T_{EFF}$ - und  $T_{EM}$ -Zellen effizient in periphere bzw. nicht-lymphatische Gewebe, wie Leber, Lunge, Haut, Lamina Propria des Darms sowie zu Entzündungsstellen [37] [38]. Obwohl der CCR7<sup>+</sup>/L-Selektin<sup>high</sup> Phänotyp typisch ist für die Migration von  $T_{CM}$ -Zellen zu LN, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Zellen nicht auch periphere Gewebe infiltrieren können [45]. Aufgrund dieser Beobachtungen wird deutlich, dass die Unterscheidung zwischen  $T_{CM}$ - und  $T_{EM}$ -Zellen schwierig sein kann. Daher werden  $T_{CM}$ -Zellen als Antigen-erfahrene T-Zellen bezeichnet, die die Fähigkeit besitzen zu PLN zu migrieren (CCR7<sup>+</sup>/L-Selektin<sup>high</sup>). Im Gegensatz dazu stehen  $T_{EM}$ - und  $T_{EFF}$ -Zellen, denen die Expression der genannten *homing*-Rezeptoren fehlen.

#### ***Gewebsspezifische Homing-Rezeptoren***

Aufgrund der fehlenden Expression der oben genannten *homing*-Rezeptoren CCR7 und L-Selektin sind  $T_{EFF}$ - und  $T_{EM}$ -Zellen zwar nicht in der Lage in sekundäre lymphatische Gewebe einzuwandern, besitzen aber die Fähigkeit in nicht-lymphatische Gewebe, wie den Darm oder die Haut zu wandern [46]. T-Zellen der Haut exprimieren Liganden für E- und P-Selektin [47], sowie die Chemokinrezeptoren CCR4 und/oder CCR10 [48] [49], die entscheidend für diesen *homing*-Prozess sind [50]. Außerdem werden E- und P-Selektin auf entzündetem Endothel in den meisten Geweben, inklusive der Haut, hochreguliert. Jedoch werden E- und P-Selektin in der Haut, im Gegensatz zu anderen Geweben,

konstitutiv auf den Venolen exprimiert [51]. Die Liganden für CCR4 und CCR10 (CCL17/TARC und CCL27/CTACK) konnten sowohl auf entzündetem und nicht-entzündetem Endothel der Haut gefunden werden [48] [52]. T-Zellen, die in die Lamina Propria des Darms wandern, exprimieren andere *homing*-Rezeptoren, wie das Integrin  $\alpha_4\beta_7$ , das in hoher Dichte auf diesen Zellen gefunden werden kann, sowie den Chemokinrezeptor CCR9 [35] [53]. Beide Moleküle sind notwendig für die effiziente Migration von T-Zellen in den Dünndarm. Hierzu passend wird der Hauptligand von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, MAdCAM-1, auf Venolen mit hohem Endothel in der Lamina Propria des Darms exprimiert [32]. Der Ligand für den Chemokinrezeptor CCR9, CCL25/TECK, wird stark auf epithelialen Zellen im Dünndarm und auf Venolen der Lamina Propria exprimiert [54]. Die Deletion von CCR9 in Mäusen verursacht lediglich eine geringe Reduktion der intraepithelialen Lymphozyten (*intraepithelial lymphocytes* - IELs) ( $\text{TCR}\gamma\delta^+$ ) des Dünndarms, was darauf schließen lässt, dass andere, bisher nicht bekannte Chemokine diesen Defekt kompensieren [55]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl das Fehlen von CCR9 als auch die Blockade von CCL25 zu einer drastischen Verringerung von Antigen-spezifischen  $\text{CD8}^+$ -Zellen im Dünndarm nach intraperitonealer Immunisierung führt [56]. Interessanterweise wird die Migration von T-Zellen in den Dickdarm (Colon), zumindest teilweise, von anderen Mechanismen kontrolliert. Obwohl auch hier das Integrin  $\alpha_4\beta_7$  eine Rolle spielt (auch unter entzündlichen Bedingungen), ist in diesem Zusammenhang das Integrin  $\alpha_4\beta_1$  zu nennen [57]. Das Colon beherbergt keine CCR9<sup>+</sup>-Zellen und dessen Ligand CCL25 wird in diesem Gewebe ebenfalls nicht exprimiert [53] [58]. Außerdem hat die Blockierung dieses Chemokinrezeptorpaars keine Auswirkungen auf die Adhäsion von T-Zellen im Colon [54]. Daher liegen der Migration von T-Zellen in den Dickdarm wahrscheinlich andere Mechanismen und beteiligte *homing*-Rezeptoren zugrunde. Ein möglicher Kandidat ist das Chemokin CCL28/MEC, welches auf epithelialen Zellen des Colons exprimiert wird [59], obwohl dessen Rezeptor CCR10 nur auf mukosalen Antikörper-sezernierenden Zellen (*antibody secreting cells* - ASC) und nicht auf intestinalen T-Zellen zu finden ist [60]. Das zweite  $\beta_7$ -Integrin,  $\alpha_E\beta_7$ , konnte ebenfalls mit dem *homing* von Zellen in den Darm in Verbindung gebracht werden.  $\alpha_E$ -Integrin defiziente Mäuse zeigen eine leichte Verringerung in der Anzahl der IELs und T-Zellen der Lamina Propria [61]. Jedoch konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin nicht notwendig ist für die Rezirkulation der T-Zellen in den Darm [62]. Außerdem konnte bisher kein Ligand für dieses Integrin auf intestinalen Venolen gefunden werden; der einzig bekannte Ligand für  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin, E-Cadherin, wird nur auf epithelialen Zellen exprimiert. Einige Untergruppen von  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  ( $\text{Foxp3}^+$ ) regulatorischen T-Zellen ( $\text{T}_{\text{reg}}$ ) zeigen ebenfalls Gewebsspezifität und exprimieren sowohl *homing*-Rezeptoren der Haut als auch des Darms [63]. Diese Vielseitigkeit in Hinsicht auf

die Expression von verschiedenen *homing*-Molekülen könnte es  $T_{REG}$ -Zellen erlauben, ihre Suppressor-Funktion in sekundären lymphatischen Organen und in peripheren Geweben auszuüben.



## Homing von Antikörper-sezernierenden Zellen (ASC)

Nachdem konventionelle B-Zellen in sekundären lymphatischen Organen ihrem entsprechenden Antigen begegnet sind, differenzieren sie entweder zu ASC, die nicht die Kapazität zur Proliferation besitzen, oder zu Gedächtnis B-Zellen ( $B_{mem}$ ), die proliferieren können und aus denen wiederum ASC entstehen können [64]. ASC, die IgG sezernieren (und im geringen Ausmaß auch IgE und IgA) verlassen die lymphatischen Gewebe und wandern hauptsächlich zum Knochenmark, wo dann ein kleiner Anteil der Zellen zu langlebigen Plasmazellen differenziert [65]. Für die Migration der B-Zellen ins Knochenmark sind CXCR4 und vermutlich  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin, LFA-1, Liganden von P-Selektin sowie CD22 verantwortlich [66] [67]. Einige ASC migrieren auch zu Entzündungsstellen; hierfür verantwortlich ist u.a. wahrscheinlich das Chemokin CXCR3 [65].

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass IgA-sezernierende Plasmazellen (IgA-ASC) vorzugsweise in den Darm migrieren [68] [69]. Tatsächlich konnten Studien an humanen intestinalen Plasmazellen sowie an  $\beta_7$ -Integrin defizienten Mäusen beweisen, dass das Integrin  $\alpha_4\beta_7$  von entscheidender Bedeutung für die Ansammlung von IgA-ASC im Darm ist [70] [35]. Kürzliche Untersuchungen konnten zeigen, dass Plasmazellen in mukosalen Kompartimenten das Chemokin CCR10 exprimieren [71] und dass CCL28, der

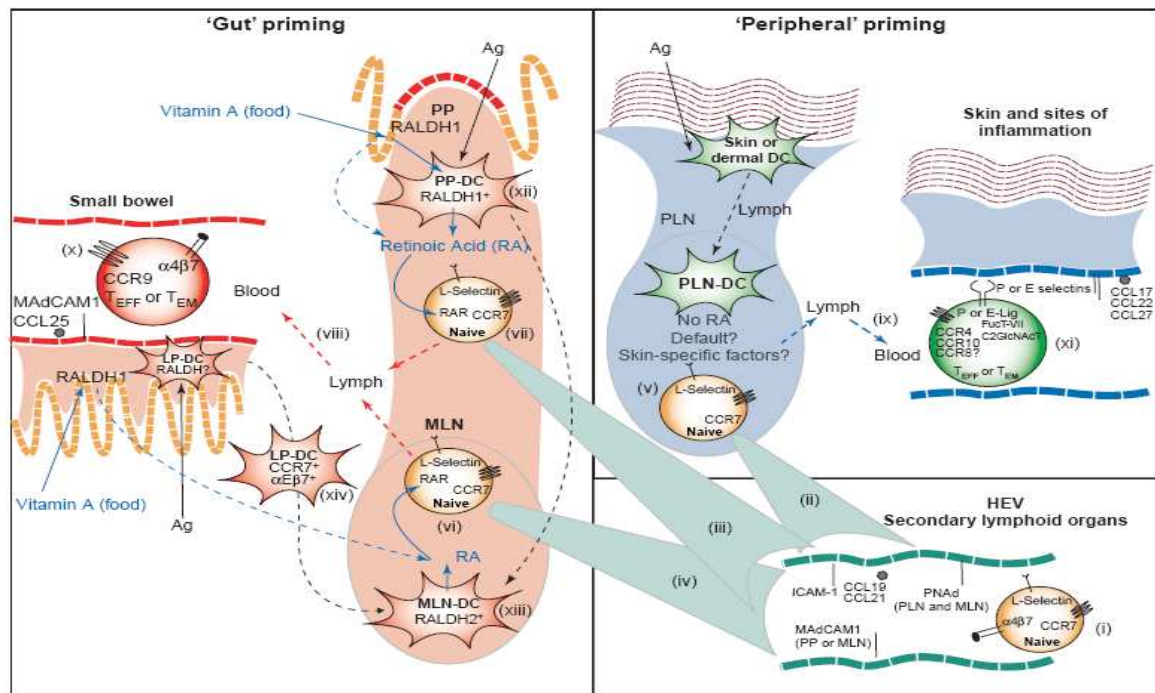
Ligand von CCR10, von den meisten epithelialen Zellen der Mukosa exprimiert wird [59]. IgA-ASC benötigen CCL28 um effizient in die Lamina Propria des Colons zu migrieren [72]. Eine Untergruppe von IgA-ASC werden außerdem von dem CCR9-Liganden CCL25 beeinflusst [73] und neue Studien haben zudem gezeigt, dass ASC, analog zu T-Zellen, CCR9 benötigen, um in den Dünndarm zu wandern [72] [74].

### ***Gerichtetes homing von Lymphozyten: Darm versus Haut***

Naive T-Zellen besitzen die Fähigkeit nach der Aktivierung jeglichen *homing*-Rezeptor auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Jedoch hat der Ort des Antigeneintritts in den Organismus einen erheblichen Einfluss auf das letztendliche Muster der Rezeptoren auf den Lymphozyten. Pathogene, die durch die Haut eindringen, aktivieren Lymphozyten mit *homing*-Molekülen für die Haut [75]. Andererseits führt die orale Gabe von Antigen zur Aktivierung von  $\alpha_4\beta_7^{\text{high}}$  - Lymphozyten, im Gegensatz zur parenteralen Verabreichung des gleichen Antigens. Außerdem hängt das Migrationspotential der aktivierten Lymphozyten von der Umgebung des jeweiligen lymphatischen Gewebes ab; in MLN aktivierte T-Zellen zeigen eine hohe Expression von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR9 verglichen mit T-Zellen, die in den PLN der Haut aktiviert wurden [76].

DCs sind notwendig für eine effiziente Aktivierung von T-Zellen. Sie beeinflussen viele Funktionen von T- und B-Zellen, wie die richtige Balance von Th1/Th2-Immunantworten oder den Isotypenwechsel von Antikörpern. Sie sind in der Lage T-Zellen zu aktivieren und können das *homing* dieser Zellen in den Darm beeinflussen.

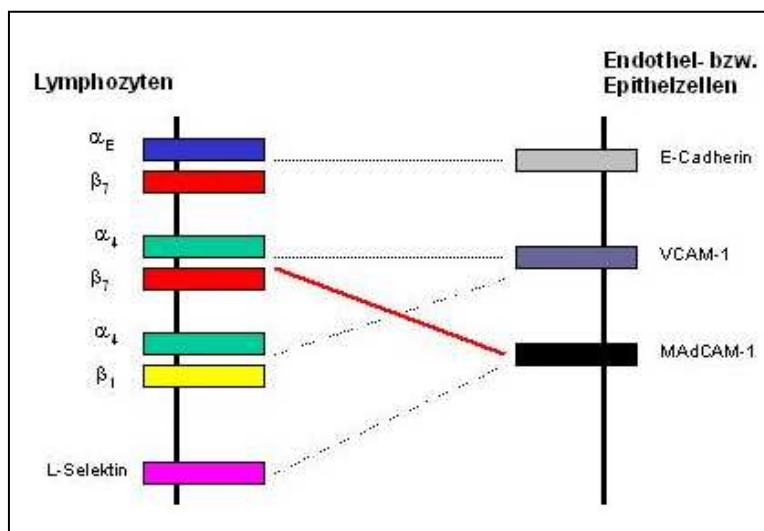
Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Retinolsäure (RA, Metabolit von Vitamin A) einen entscheidenden Einfluss auf die Expression bestimmter *homing*-Rezeptoren hat. Das Fehlen von Vitamin A in der Nahrung von Mäusen führt zu einer drastischen Abnahme von Effektor- und Gedächtnis T-Zellen in der Mukosa des Darms [77]. Durch *in vitro* Experimente konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Retinolsäure während der Aktivierung von T-Zellen die Expression der *homing*-Rezeptoren  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CCR9 induzieren kann. Außerdem blockt Retinolsäure die Hochregulierung der E- und P-Selektin Liganden auf T-Zellen, ein Phänomen welches ebenfalls während der Aktivierung von T-Zellen in der Gegenwart von PP-DCs beobachtet werden konnte, auch wenn DCs in diesem Fall nicht die Antigen-präsentierenden Zellen waren [78]. Zu erwähnen ist ebenfalls, dass DCs aus dem Darm (aus PPs und MLNs) eine hohe Expression von Retinalaldehyd-Dehydrogenasen zeigen (RALDHs), welche wichtige Enzyme bei der Biosynthese von Retinolsäure sind. Die Fähigkeit Retinolsäure zu produzieren ist daher ein wichtiger Mechanismus durch den intestinale DCs die Migration von Zellen in den Darm induzieren können.



**Abb. 1.4: Homing-Mechanismen sowie Expressionsmuster von Darm- bzw. Haut-spezifischen T-Zellen (nach Mora und von Andrian [79])**

#### 1.4 Bedeutung der homing-Rezeptoren MAdCAM-1 und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin

Im vorigen Abschnitt wurde der Mechanismus des *homings* von Lymphozyten näher erläutert. Unter anderem wurde die Migration von T-Zellen in das darmassoziierte lymphatische Gewebe mit allen beteiligten Molekülen vorgestellt. Zu diesen Molekülen gehören die schon mehrmals erwähnten Interaktionspartner MAdCAM-1 und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, die nun im folgenden näher beschrieben werden.



**Abb. 1.5: Übersicht der auf Lymphozyten und Endothel- bzw. Epithelzellen exprimierten homing-Rezeptoren: hervorgehoben sind die Interaktionspartner  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und MAdCAM-1.**



### 1.4.1 MAdCAM-1

Das mukosale vaskuläre Adressin MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) wurde ursprünglich 1988 von Streeter und Kollegen identifiziert. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers MECA-367 konnte damals herausgefunden werden, dass es sich bei MAdCAM-1 um ein endotheliales Oberflächenprotein handelt, dessen Expression auf Endothelzellen der Mukosa beschränkt ist [80]. MAdCAM-1 ist ein ~ 60 kDa großer Multidomänenrezeptor, der aus vier extrazellulären Domänen, einer Transmembran-Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz besteht. Die beiden ersten Domänen sind homolog zu denen von VCAM-1 und ICAM-1, wohingegen die dritte Domäne Mucin-ähnlich ist. Die vierte Membran-proximale Domäne weist Homologien zur C $\alpha$ 2 Domäne von IgA1 auf. MAdCAM-1 gehört, wie auch VCAM-1 und die ICAMs, zur Immunglobulin-Superfamilie. Diese Familie zeichnet sich durch die bereits erwähnten durchgängig ähnlichen Immunglobulin-Domänen aus. Eine Domäne besteht aus zwei  $\beta$ -Faltblättern, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind und eine zylinderartige Form, den sogenannten  $\beta$ -Zylinder bilden [81]. Die Superfamilie umfasst Immunglobuline, T-Zell-Rezeptoren sowie Zelladhäsionsmoleküle. MAdCAM-1 wird auf der Oberfläche der HEVs im Darm, der PPs und der MLNs exprimiert, jedoch nicht auf den HEVs der PLNs [32]. Des Weiteren findet man es auf laktierenden Brustdrüsen, auf endothelialen Zellen des Gehirns sowie in der Marginalzone der Milz [82] [83]. Außerdem kann die Expression von MAdCAM-1 durch TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) sowie IL-1 induziert werden [83]. Als Liganden für MAdCAM-1 dienen, wie in Abb. 1.5 zu sehen ist, L-Selektin und das Integrin  $\alpha_4\beta_7$ . Beide Liganden werden auf Lymphozyten exprimiert, die in das lymphatische Gewebe des Darms rezirkulieren. Die Rolle von MAdCAM-1 als endothelialer Interaktionspartner von L-Selektin und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, sowie der Mechanismus des *homings* wurde bereits in Abschnitt 1.3 näher erläutert.

Neben der basalen Funktion von MAdCAM-1 während der Migration von Lymphozyten, spielt es zudem eine Rolle während verschiedener entzündlicher Erkrankungen. In chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED oder *inflammatory bowel disease* - IBD), insbesondere Morbus Crohn, dient MAdCAM-1 als Rezeptor für  $\alpha_4\beta_7$ -exprimierende Lymphozyten, und rekrutiert diese in den Darm, wo sie eine chronische Entzündung auslösen und aufrechterhalten [84]. Die Beteiligung der Interaktion von MAdCAM-1 und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin für die Entstehung von Kolitis konnte sowohl mithilfe von Tiermodellen als auch anhand humaner Studien bewiesen werden [85] [86]. In experimentellen Kolitis-Modellen konnte gezeigt werden, dass die Blockierung von MAdCAM-1 zu einer Reduktion der Leukozyten-Extravasation und zu einem Rückgang der Entzündung im Darm führt [87] [88]. Eine Reduktion der Lymphozytenmigration in das GALT, sowie eine Runterregulierung der MAdCAM-1 Expression konnte außerdem in einem ähnlichen

Kolitis-Modell, allerdings nach der Blockierung von Lymphotoxin  $\beta$ , beobachtet werden [89]. Von Shigematsu und Kollegen konnte in einem  $CD4^+CD45RB^{high}$  Kolitis-Modell derselbe Effekt von MAdCAM-1 bezüglich der Adhäsion und Migration von Leukozyten gezeigt werden [86].

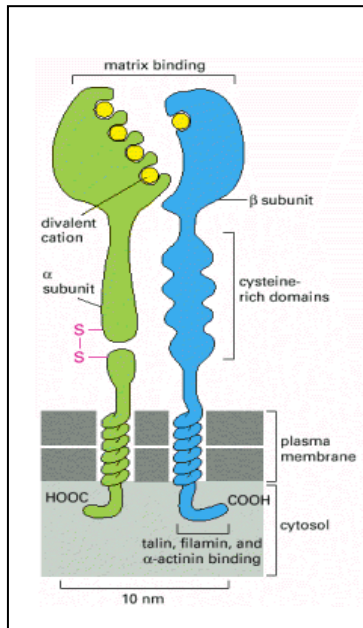
Des Weiteren konnte mit Hilfe von Mausmodellen die Beteiligung von MAdCAM-1 während der Entstehung anderer Erkrankungen beschrieben werden. 2001 wurde von Grant und Kollegen gezeigt, dass die Expression von MAdCAM-1 während autoimmuner Hepatitis die Adhäsion von mukosalen Lymphozyten an das Leber-Endothel fördert und so die Entzündung in der Leber verstärkt [90]. Eine Beteiligung von MAdCAM-1 konnte außerdem für PSC (Primär sklerosierende Cholangitis) und PBZ (Primär biliäre Zirrhose) beschrieben werden; hierbei handelt es sich um eine chronische Entzündung der Gallengänge bzw. eine seltene Autoimmunerkrankung der Leber. Bei beiden Erkrankungen konnte eine drastische Erhöhung der MAdCAM-1 Expression gezeigt werden [91]. Auch bei der Entwicklung von Diabetes scheint die Interaktion von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und MAdCAM-1 eine Rolle zu spielen; zum einen ist MAdCAM-1 verantwortlich für den Eintritt von naiven Lymphozyten in das lymphatische Gewebe, in dem die Diabetes-auslösenden Lymphozyten geprimed werden. Zum anderen ist es verantwortlich für das anschließende *homing* dieser Immunzellen in den Pankreas [92].

### 1.4.2 Integrine

#### **Allgemeine Einleitung zu Integrinen**

Bei den Integrinen handelt es sich um eine Superfamilie von Zelladhäsionsmolekülen, die hauptsächlich Komponenten der ECM sowie Liganden auf der Zelloberfläche binden. Integrine werden auf Vertebraten- und Invertebratenzellen exprimiert und wirken als „Integratoren“, indem sie eine Verknüpfung zwischen der ECM und dem intrazellulären Zytoskelett der Zelle herstellen können. Des Weiteren besitzen sie die Fähigkeit Signale bidirektional zu transduzieren, was entscheidend zu Prozessen wie der Entwicklung des Organismus, der Migration oder der Adhäsion von Zellen beiträgt.

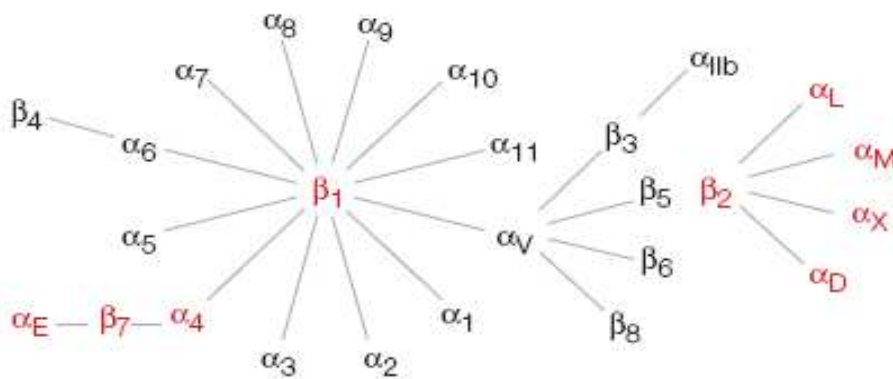
Integrine sind transmembrane Heterodimere, die sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammensetzen (s. Abb. 1.6).



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Integrin-Heterodimers** (aus Alberts et al. [184])

In Vertebraten sind gegenwärtig 18  $\alpha$ -Untereinheiten und 8  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, die 24 verschiedene Rezeptoren bilden (s. Abb. 1.7). Verstärkt wird diese Vielfalt durch alternatives Spleißen einiger Integrin-mRNAs. Aufgrund verschiedener Untersuchungen, wie Röntgenstrukturanalysen sowie elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist die im Folgenden beschriebene Struktur der Integrine allgemein anerkannt: der globuläre Kopf des Dimers ragt aus der Lipid-Doppelschicht der Membran in den Extrazellulärraum und bindet an spezifische Matrixproteine, während intrazellulär das C-terminale Ende mit Komponenten des Zytoskeletts assoziiert ist. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sind glykosyliert und werden durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten. Beide Untereinheiten besitzen eine große extrazelluläre Domäne (~ 1200 AS in der  $\alpha$ -Untereinheit, ~800 AS in der  $\beta$ -Untereinheit), eine hydrophobe Transmembran-Domäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne (~50 AS). Die Ausnahme bildet das  $\beta_4$ -Integrin mit einer zytoplasmatischen Domäne von ca. 1000 AS. Die Bindung der Integrine an seinen Liganden wird durch beide Untereinheiten vermittelt und kann von extrazellulären zweiwertigen Kationen, entweder  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ , abhängen. Die Ligandenspezifität der Integrine scheint hauptsächlich von der extrazellulären Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit abhängig zu sein [93]. Für die Funktion des Rezeptors sind jedoch beide Untereinheiten von Bedeutung. Ein Großteil der Integrine erkennt das Tripeptid RGD (Arg-Gly-Asp); diese Sequenz ist in verschiedenen Liganden der Integrine zu finden und dient diesen als Erkennungssequenz.



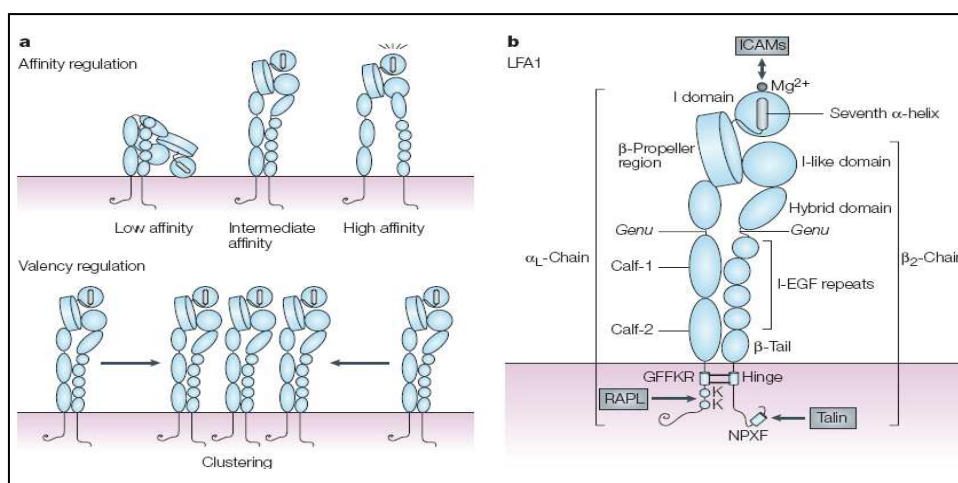


**Abb. 1.7: Die Integrin-Superfamilie.** Verschiedene Assoziationen zwischen den bisher bekannten 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten erlauben die Bildung von mindestens 24 verschiedenen Rezeptoren. Integrine, die auf Leukozyten exprimiert werden, sind in rot dargestellt (nach Kinashi [94]).

In Säugetieren sind einige Integrine nur auf bestimmten Zelltypen oder Geweben zu finden:  $\alpha_{IIb}:\beta_3$ -Integrin auf Thrombozyten,  $\alpha_6:\beta_4$ -Integrin auf Keratinozyten,  $\alpha_E:\beta_7$ -Integrin auf IELs, DCs und Mastzellen in mukosalen Geweben sowie  $\beta_2$ - und  $\alpha_4$ -Integrine nur auf Leukozyten. Andere Integrine werden auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, so zum Beispiel  $\alpha_V:\beta_3$ -Integrin. Neben dem RGD-Motif, welches ursprünglich in Fibronectin als Integrin-bindendes Motif identifiziert werden konnte [95], erkennen Integrine auch andere Sequenzen in ihren Liganden, so wie das Tripeptid LDV welches man bei Mitgliedern der Ig-Superfamilie findet. Hinsichtlich ihrer Ligandenspezifität können Integrine in verschiedene Gruppen unterteilt werden: Laminin-bindende Integrine, Kollagen-bindende Integrine, Integrine auf Leukozyten sowie RGD-erkennende Integrine. Weiterhin werden sie aufgrund des Vorhandenseins der I-Domäne (*inserted domain*) in der  $\alpha$ -Untereinheit definiert. I-Domänen spielen eine zentrale Rolle in der Ligandenbindung und in der interzellulären Adhäsion. Nach der Bindung eines extrazellulären Liganden, wie Kollagen oder Laminin, generieren Integrine ein intrazelluläres Signal; umgekehrt kann die Funktion der Integrine auch durch intrazelluläre Signale reguliert werden [96]. Wie schon erwähnt wurden dienen Integrine als transmembrane Verbindung zwischen extrazellulären Kontakten (andere Zellen oder ECM) und den Mikrofilamenten des Zytoskeletts, dessen Verhalten und Dynamik ebenfalls von Integrinen reguliert und moduliert werden kann. Viele verschiedene zytoplasmatische Proteine, wie z.B. Talin, Vinculin oder ERM-Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin), agieren als *Linker*, um die zytoplasmatische Domäne der Integrine mit dem Zytoskelett zu verbinden. Die extrazelluläre Bindung von Integrinen kann eine Vielzahl von Signaltransduktionsereignissen auslösen, die Einfluss haben auf verschiedene Vorgänge, wie Adhäsion, Proliferation, Überleben oder Apoptose, Zellform- und polarität, Motilität, Genexpression sowie Differenzierung [93] [97].

### Affinitätsregulierung von Integrinen durch inside-out signalling

Die adhäsiven Interaktionen von Immunzellen sind für gewöhnlich dynamisch und kurzlebig. Lymphozyten werden durch Chemokine und/oder Antigene aktiviert und können bereits innerhalb weniger Sekunden mit anderen Zellen oder Komponenten der ECM interagieren. Fundamental für diesen Prozess ist die Fähigkeit von Integrinen ihre Avidität, d.h. ihre absolute Ligandenbindungsstärke, durch *inside-out signalling* Ereignisse zu verändern [98]. Dieser Prozess kann einerseits die Affinität von Integrinen für ihre Liganden modulieren und andererseits das Ausmaß in dem Integrine sich auf der Zelloberfläche anhäufen (*clustern*) beeinflussen [99]. Nach Stimulierung erlangen Lymphozyten die Fähigkeit an endotheliale Zellen, APCs oder Komponenten der ECM zu adhären. Durch Strukturanalysen von Integrinen konnte die Basis der Affinitätsregulierung offen gelegt werden [100]. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bilden zusammen einen globulären, Liganden-bindenden Kopf; dieser ist mit der Plasmamembran durch zwei „Stängel“ (*stalk*, einer von jeder Untereinheit) verbunden, und jede Untereinheit besitzt wie schon erwähnt eine kurze zytoplasmatische Domäne (siehe Abb. 1.8). Veränderungen in der Affinität sind verbunden mit deutlichen Konformationsänderungen in der extrazellulären Domäne der Integrine. Diese Konformationsänderungen bewirken, dass Integrine in verschiedenen Aktivierungszuständen vorliegen können. In der gering-affinen Konformation ist die „Stängel“-Region am *Genu* (Knie) gebeugt, was zur Folge hat, dass das Liganden-bindende Kopfstück eng an die Membran-proximale „Stängel“-Region anliegt. Ein Aufklappen der „Stängel“-Regionen bringt den Rezeptor schließlich in eine hoch-affine Konformation (siehe Abb. 1.8).



**Abb. 1.8: Struktur und Regulierung von Integrinen.** In der oberen Abb. (a) sind die verschiedenen Konformationszustände der Integrine dargestellt. Dieser Prozess wird als Affinitätsregulierung von Integrinen bezeichnet. Darunter ist das clustern der Integrine auf der Zelloberfläche dargestellt, welches multivalente Interaktionen mit Liganden ermöglicht. Dieser Prozess wird als Valenzregulierung von Integrinen bezeichnet. In der rechten Abb. (b) ist schematisch die Struktur von LFA-1 dargestellt (nach Kinashi [94]).

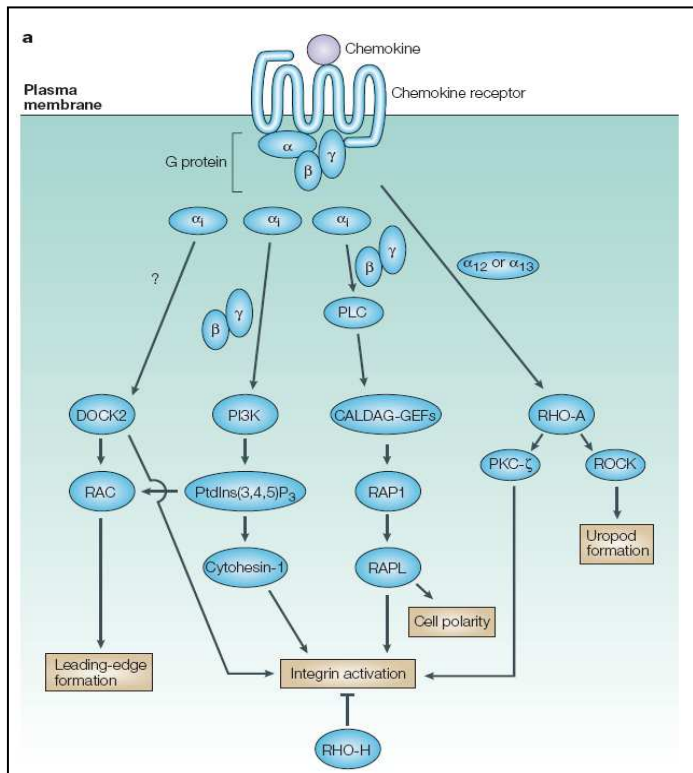
Die Liganden-bindende I-Domäne von LFA-1 (siehe Abb. 1.8) bindet ICAM-1 in Abhängigkeit von divalenten Kationen. Diese werden in der MIDAS-Sequenz (*metal-ion-dependent adhesion site*) der  $\alpha$ -Untereinheit gebunden. Bewegungen der siebten  $\alpha$ -Helix in der I-Domäne bewirken schließlich Konformationsänderungen, die zu einem hoch-affinen Rezeptor führen [101].

Die Schlüsselfrage beim *inside-out signalling* ist, ob die Veränderungen in den extrazellulären Regionen der Integrine durch die zytoplasmatischen Domänen bewerkstelligt werden können. Das Membran-proximale Motif GFFKR in der zytoplasmatischen Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit, welches sich in der *hinge*-Region befindet, ist bei allen Integrinen konserviert. Dieses Motif dient als negativ-regulatorische Sequenz indem es die Integrin-Aktivierung unterdrückt [102]; gezeigt werden konnte das durch die Deletion des GFFKR-Motifs, was in einem konstitutiv aktiven Rezeptor resultiert. Das Arginin (R) in diesem Motif und ein Aspartat-Rest (D) an der entsprechenden Position in der  $\beta$ -Untereinheit bilden eine Salzbrücke, die die zytoplasmatischen Regionen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit in Juxtaposition bringen. Diese Konformation hält das Integrin in einem gering-affinen Zustand.

Die Induktion von *inside-out signalling* kann sowohl durch Chemokine als auch durch die Ligation des T-Zell-Rezeptors erfolgen. Chemokine, die an der apikalen Oberfläche des Endothels zu finden sind, können die Avidität von Integrinen steigern, was den Arrest der Lymphozyten auf dem Endothel zur Folge hat. Dies geschieht durch die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, einschließlich PI3K- (*phosphatidylinositol 3-kinase*), PLC- (*phospholipase C*), RAS- und RHO- (*RAS homologue*) GTPasen, sowie MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) Signalkaskaden. PI3K spielt eine entscheidende Rolle in der effizienten Chemotaxis von Lymphozyten. Die Inhibierung von PI3K blockiert das durch Chemokine ausgelöste LFA-1 *clustern* auf der Zelloberfläche sowie die Adhäsion an ICAM-1 [103]. Auch kleine GTPasen, wie RHO-A und RAP1 sind von Bedeutung für die von Chemokinen ausgelöste Aktivierung von Integrinen. Das durch RHO vermittelte *signalling* ist entscheidend für die Aktivierung von LFA-1 sowie für das durch LFA-1 bedingte *homing* der Lymphozyten *in vivo* [103] [104]. Jedoch findet man in der RAS-Superfamilie der kleinen GTPasen auch negative Regulatoren. Das Protein RHO-H, welches nur auf Leukozyten zu finden ist, ist ein negativer Regulator der Avidität von LFA-1. Die Inaktivierung von RHO-H induziert die konstitutive Aktivierung von LFA-1 und die damit verbundenen strukturellen Veränderungen in einen hochaffinen Rezeptor [105].

Die transiente Aktivierung von Integrinen durch Chemokine erlaubt es Lymphozyten eine APC nach dem entsprechenden Antigen abzusuchen. Erkennen T-Zellen nun ihr spezifisches Antigen auf diesen Zellen, findet die Ligation des TCR mit dem Peptid-MHC-

Komplex statt. Diese Ligation wiederum löst die dynamische Neuorganisation des TCR und der beteiligten Integrine zu dem Ort des Kontakts aus und die Formierung einer stabilen Adhäsion, der sogenannten immunologischen Synapse, wird ausgelöst. Verschiedene Signalmoleküle, wie Mitglieder der TEC-Kinase Familie, sowie RAC, ADAP und RAP1 sind wichtige Mediatoren des TCR-*signallings*. Eine Aktivierung dieser Kinasen stimuliert die Integrin-abhängige Adhäsion von T-Zellen und reguliert somit die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen [106].



**Abb. 1.9: Inside-out Signalkaskaden** (nach Kinashi [94])

## Signaltransduktion durch Integrine (outside-in signalling)

Die extrazelluläre Bindungsaktivität von Integrinen wird, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, durch *inside-out* Signalkaskaden reguliert. Dies führt zum *clustern* von hochaffinen Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die Liganden der ECM binden und somit den Extrazellulärraum mit dem Inneren der Zelle verbinden. Eine direkte Signaltransduktion durch Integrine wird durch das *outside-in signalling* gewährleistet, welches durch die Bindung von Liganden der ECM zu Stande kommt und *downstream*-Signalkaskaden in der Zelle auslöst. Die zyttoplasmatischen Domänen der Integrine, die kurz sind und keine enzymatischen Eigenschaften besitzen, spielen die zentrale Rolle bei der Auslösung und Transduktion von Signalen innerhalb der Zelle.

Aufgrund der Größe ihrer zytoplasmatischen Domänen sind Integrine mit verschiedenen Adapterproteinen assoziiert, durch die sie Signale weiterleiten. Diese Adapterproteine verbinden sie einerseits mit dem Zytoskelett und andererseits mit zytoplasmatischen Kinasen und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren.

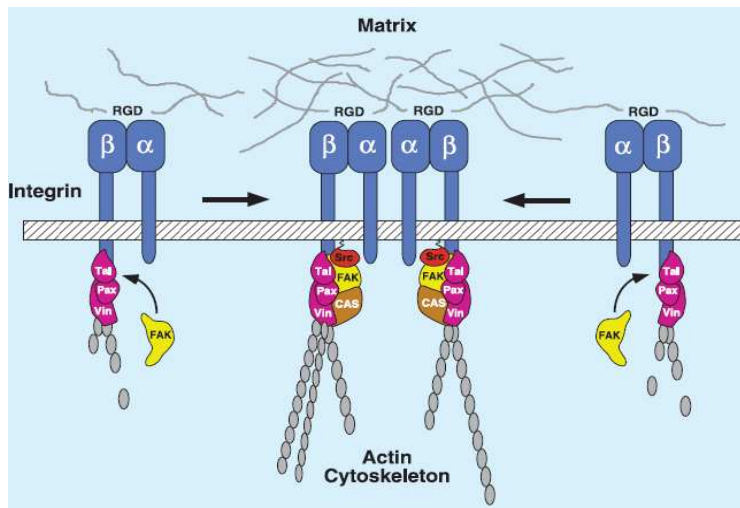
Integrine aktivieren verschiedene Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs), einschließlich der FAK (*focal adhesion kinase*), Kinasen der Src-Familie sowie ILK (*integrin-linked kinase*, Serin-Threonin Kinase) [107] [97]. Der FAK-Signalweg wird durch die meisten Integrine aktiviert. Die Aktivierung von FAK ist in der Regel mit dem Aufbau von Fokalkontakten verknüpft. FAK wird zu Fokalkontakten rekrutiert, da es entweder direkt oder durch zytoskeletale Proteine wie Talin oder Paxillin, mit der zytoplasmatischen Domäne der Integrin  $\beta$ -Untereinheit interagiert [108]. Auf die Aktivierung von FAK erfolgt eine Autophosphorylierung der Kinase, wobei eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne der Kinasen Src oder Fyn geschaffen wird [109]. Src wiederum ist dann in der Lage verschiedene Adhäsionskomponenten zu phosphorylieren, wie die zytoskeletalen Proteine Paxillin und Tensin oder das Docking-Protein p130<sup>CAS</sup>. Des Weiteren kann FAK, entweder direkt oder durch Src, PI3K binden und aktivieren [110]. Letztendlich führen alle von FAK ausgelösten Signalwege zu Modifikationen des Zytoskeletts und zur Aktivierung von MAPK-Signalkaskaden.

Neben der Aktivierung von FAK sind einige Integrine, darunter die  $\beta_1$ - und  $\alpha_v$ -Integrine, in der Lage die Tyrosin-Kinase Fyn und dadurch das Adapterprotein Shc zu aktivieren [107]. In diesem Signalweg dient das membranständige Protein Caveolin-1 als Adapter, um die Integrin  $\alpha$ -Untereinheit mit Fyn zu verbinden. Nachdem Integrine an Liganden der ECM gebunden haben, wird Fyn aktiviert und dessen SH3-Domäne interagiert mit Shc. Sowohl die Aktivierung von FAK als auch Shc führt in den meisten Fällen zur Auslösung von ERK- (*extracellular signal-regulated kinase*) MAPK-Signalkaskaden.

Zusätzlich zur direkten Auslösung von intrazellulären Signalkaskaden sind Integrine für die optimale Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren notwendig. Verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren, wie der Rezeptor für Insulin, PDGF (*platelet-derived growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*) oder VEGF (*vascular endothelial growth factor*) sind mit Integrinen assoziiert und können nur optimal von ihren Liganden aktiviert werden, wenn die beteiligten Zellen angemessen mit Komponenten der ECM oder anderen Zellen verbunden sind [111] [112].

Das *signalling* von Integrinen hat außerdem Einfluss auf Zellwachstum, Zelltod und die Regulierung des Zellzyklus. So unterstützen Integrine z.B. die durch Wachstumsfaktoren-vermittelte Aktivierung von ERK. Die Aktivierung von ERK wird für das Wachstum von Zellen benötigt, da es die Phosphorylierung von *Ternary Komplex* Faktoren (TCFs) ermöglicht, welche unter anderem die Transkription des *immediate-early gene* c-Fos

fördern [113]. In einem anderen Signalweg aktivieren Integrine die Kinase JNK (*c-Jun N<sub>H</sub>-terminal kinase*), die den Verlauf durch die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus reguliert. Aktivierte JNK geht in den Nukleus und phosphoryliert dort den Transkriptionsfaktor c-Jun, welcher an c-Fos bindet, um den AP-1 Transkriptionsfaktorkomplex zu bilden. Dieser Komplex ist dann in der Lage Gene zu regulieren, die für die Proliferation von Zellen benötigt werden [113].



**Abb. 1.10: Schematische Darstellung der Assoziationen von Integrinen mit Matrix-Proteinen und Proteinen des Zytoskeletts** (nach Giancotti und Ruoslahti [97])

### Die zytoplasmatischen Domänen der Integrine

Obwohl die zytoplasmatischen Domänen der Integrine relativ kurz sind und keine enzymatischen Aktivitäten besitzen, spielen sie eine zentrale Rolle in der durch Integrine vermittelten Funktionen. Die zytoplasmatischen Domänen der  $\beta$ -Untereinheiten weisen eine starke Homologie untereinander auf, im Gegensatz zu den Domänen der  $\alpha$ -Untereinheiten, die stark voneinander divergieren. Die meisten Integrin  $\beta$ -Untereinheiten enthalten ein oder mehrere NPxY/F Motife (s. Abb. 1.11), welche einen Teil der Erkennungssequenz für Phosphotyrosin-bindende (PTB) Domänen darstellen. Es handelt sich hierbei um ein Protein-Modul, das man in vielen Signalmolekülen und zytoskeletalen Proteinen findet. Die Phosphorylierung des Tyrosins in diesem Motif trägt wahrscheinlich zur Regulierung von Integrin-Interaktionen mit anderen Proteinen bei. Die konservierte Membran-proximale Sequenz LLv\_iHDR der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta$ -Untereinheit reguliert ebenfalls die Integrin-Affinität. Als dritte regulatorische Region findet man bei den meisten Integrinen die distal gelegene TTT-Region; es handelt sich hierbei um eine Sequenz von neun AS, die gut konserviert bei  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrinen zu finden ist.



LLv-iHDR-Motif			NPxY/F-Motif		TTT-Region	
$\beta_7$ : R	LSVEIYDR	REYRRFEKEQQQLNWKQDN	NPLYK	SAI	TTTVNPRF	QGTNGRSPSLSLTREAD
$\beta_1$ : K	LLMIHDR	REFAKFEKEKMNAKWDGTE	NPIYK	SA	VTTVVNPKY	EGK
$\beta_2$ : K	ALHTLTDL	REYRRFEKEKLKSQWN-ND	NPLFK	SA	TTVMNPKF	AES
$\beta_3$ : K	LLITIHDR	KEFAKFEEERARAKWDAN	NPLYK	EA	TSTFTNITT	RGT
$\beta_5$ : K	LIVTIHFR	REFAKFQSERSRARYEMAS	NPLYR	KPI	STHTVDFTFNKFNKSYNGTVD	
$\beta_6$ : K	LLVSFHDR	KEVAKFEAERSKAKWQTGT	NPLYR	GS	TSTFKNVTYKHREKHKAGLSSDG	
Proximale Region			Distale Region			

**Abb. 1.11: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener zytoplasmatischer Domänen von  $\beta$ -Untereinheiten:** Die zytoplasmatische Domäne der  $\beta$ -Untereinheit der Integrine wird in eine proximale und eine distale Region eingeteilt. Fett hervorgehoben ist das konservierte LLv-iHDR- und das konservierte NPxY/FK-Motif (abgewandelt nach Crowe [114])

Ein Sequenzvergleich verschiedener  $\beta$ -Untereinheiten auf Abb. 1.11 zeigt, dass die zytoplasmatischen Domänen in einen proximalen, stark konservierten Bereich und einen distalen, heterogeneren Bereich unterteilt werden können. Getrennt werden die Bereiche durch das NPxY/F-Motif. Die Membran-distale Region ist sowohl in der Länge als auch in der Sequenz heterogener und man geht davon aus, dass sie die Spezifität und Diversität der einzelnen  $\beta$ -Untereinheiten ausmacht [114].

Das einzig konservierte Motif in der zytoplasmatischen Domäne der  $\alpha$ -Untereinheiten ist das proximal gelegene Motif GFFKR. Dieses Motif ist entscheidend für die Assoziation der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit. Es bildet die *hinge*-Region („Gelenk“) des Rezeptors, indem zwischen dem Arginin (R) und dem Aspartatrest (D) im LLv\_iHDR-Motif in der  $\beta$ -Untereinheit eine Salzbrücke ausgebildet wird.

Die funktionale Relevanz der zytoplasmatischen Domänen der Integrine wurde vor allem durch Deletions- und Punktmutationsanalysen demonstriert. Viele Mutationen oder Verkürzungen der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta$ -Untereinheit der Integrine führen zu konstitutiv aktiven oder völlig inaktiven Rezeptoren [115]. Eingebachte Punktmutationen in das NPxY/F Motif verhindern die Aktivierung der  $\beta_1$ - und  $\beta_3$ -Integrine [116]. Von Williams und Kollegen dagegen konnte 1994 gezeigt werden, dass die partielle Deletion des LLv\_iHDR Motifs zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor führt [117]. Mutationen in der distal gelegenen TTT-Region führen zu einer verminderten Zelladhäsion und zu einer Inhibierung der Lokalisierung von Integrinen in Fokalkontakten, vermutlich durch die fehlende Assoziation zum Zytoskelett [118].

Eine Eliminierung des GFFKR Motifs der  $\alpha$ -Untereinheit des  $\alpha_{IIB}$ -Integrins führt zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor [117]. Die durch dieses Motif ausgebildete Salzbrücke mit der  $\beta$ -Untereinheit geht mit einer Eliminierung verloren und der Rezeptor liegt nicht mehr in der inaktiven Konformation vor (die durch die ausgebildete Salzbrücke verursacht wird) sondern wird konstitutiv aktiv und somit nicht mehr regulierbar [119].

Wie schon erwähnt wurde, binden zahlreiche zytoskeletale Proteine sowie Signalmoleküle an die zytoplasmatische Domäne der  $\beta$ -Integrine. Jedoch konnten mittlerweile auch einige Proteine identifiziert werden, die mit spezifischen  $\alpha$ -Schwänzen interagieren. Mindestens 21 Proteine sind bekannt, die an eine oder mehrere  $\beta$ -Untereinheiten binden. Dazu gehören Actin-bindende Proteine, Enzyme, Adapterproteine, Transkriptionskoaktivatoren sowie Proteine mit bisher unbekannter Funktion. Das erste identifizierte und bisher prominenteste Protein, welches Integrine direkt bindet, ist Talin [120]. Bei Talin handelt es sich um ein zytoskeletales Protein, das Integrine mit dem Actin-Zytoskelett verbindet. Neben der Funktion als Adapterprotein spielt es zudem eine Rolle in der Regulation der Integrin-Affinität: die Kopfdomäne von Talin zerstört durch die Bindung an die  $\beta$ -Untereinheit die zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette ausgebildete Salzbrücke [121] [122]. Das verursacht die Dissoziation der beiden Untereinheiten und induziert somit eine Konformationsänderung in der extrazellulären Region des Integrins, was wiederum einen Anstieg der Affinität des Rezeptors für seine Liganden zur Folge hat [123]. Weitere Actin-bindende Proteine sind u.a. Filamin und  $\alpha$ -Actinin. Filamin gewährleistet wie Talin die mechanische Verbindung zwischen Integrinen und dem Zytoskelett, jedoch fungiert Filamin auch als Adapterprotein für verschiedene Signalproteine (z.B. RalA) [124]. Die Filamin-Bindungsstelle ist bei der  $\beta_{1A}$ -Untereinheit C-terminal lokalisiert und eingebrachte Mutationen in diese Region verhindern die Filamin-Bindung und führen außerdem zu einer beeinträchtigten Lokalisierung von Integrinen in Fokalkontakten [125].

Weitere Integrin-bindende Moleküle sind Signalproteine, wie FAK, ILK oder die Cytohesine, deren Funktion im vorigen Abschnitt schon näher erläutert wurde. Etliche andere Proteine mit unbekannter Funktion binden ebenfalls an die  $\beta$ -Untereinheit der Integrine; identifiziert wurden diese hauptsächlich durch *yeast two-hybrid* Analysen. Zu diesen Proteinen gehören z.B. die WD repeat Proteine Rack1 (*receptor for activated protein kinase C*) und WAIT-1 (*WD protein associated with integrin tails*) [126] [127]. Rack1 bindet an die Integrine  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_5$  sowie  $\alpha_4$  und  $\alpha_v$ . WAIT-1 bindet auch an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, nämlich  $\beta_7$ ,  $\alpha_4$  und  $\alpha_E$ . Wie Rack1 interagiert auch WAIT-1 mit einer Membran-proximalen Region in der  $\beta$ -Untereinheit. Die funktionale Relevanz der Bindung von Integrinen an diese Proteine konnte bisher jedoch noch nicht vollständig geklärt werden. Ein Beispiel für ein  $\alpha$ -Integrin bindendes Protein ist Calreticulin. Es handelt sich hierbei um ein luminales Calcium-bindendes Protein des Endoplasmatischen Retikulums, welches spezifisch mit dem hochkonservierten Motif GFFKR der  $\alpha$ -Untereinheit interagiert [128]. Ein weiteres Beispiel für ein  $\alpha$ -Integrin bindendes Protein ist Caveolin-1, ein membranständiges Adapterprotein.



### 1.4.3 $\beta_7$ -Integrine

$\beta_7$ -Integrine weisen die für  $\beta$ -Ketten übliche Struktur auf, die aus einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (61 AS), einer einfachen Transmembran-Domäne (21 AS) und einer aus 705 AS umfassenden extrazellulären Domäne besteht. In der extrazellulären Domäne findet man, wie bei anderen Integrinen auch, Cystein-reiche Wiederholungen sowie N-terminal ein Metall-Bindungsmotif mit einer I-ähnlichen Domäne. Die Expression von  $\beta_7$ -Integrin ist ausschließlich auf Leukozyten beschränkt.  $\beta_7$ -Integrine können, wie auf Abb. 1.7 zu erkennen ist, mit  $\alpha_4$ - und  $\alpha_E$ -Integrinen Heterodimere bilden [129].  $\alpha_4:\beta_7$ -Integrin findet man in niedriger Dichte auf natürlichen Killerzellen, Eosinophilen, Makrophagen, Mastzellen sowie naiven T- und B-Zellen. Eine höhere Dichte dieses Rezeptors findet man jedoch auf Effektor- bzw. Gedächtnis T- und B-Zellen. Wie in den vorigen Abschnitten dieser Arbeit schon erläutert wurde, ist das Integrin  $\alpha_4:\beta_7$  in der Lymphozytenpopulation angereichert, die in das lymphatische Gewebe des Darms (GALT) rezirkuliert, um dort auf ihr spezifisches Antigen zu treffen (*homing*). Daher zählt dieses Integrin zu den *homing*-Rezeptoren und  $\beta_7$ -Integrin exprimierende Lymphozyten sind Teil des mukosalen Immunsystems.  $\alpha_4:\beta_7$ -Integrin exprimierende Lymphozyten adhären auf HEVs der Peyer'schen Platten des GALT und binden dort an ihren endothelialen Liganden MAdCAM-1 [34]. Die Interaktion dieses Rezeptorpaars ist fundamental für die Migration sowohl naiver als auch immunkompetenter Lymphozyten in das lymphatische Gewebe des Darms. Weitere Liganden, die aber mit geringerer Affinität gebunden werden sind Fibronectin als Komponente der ECM sowie VCAM-1, das ebenfalls auf aktiviertem Endothel exprimiert wird [130]. Die Expression von  $\alpha_E:\beta_7$ -Integrin beschränkt sich, im Gegensatz zu  $\alpha_4:\beta_7$ -Integrin, auf eine im Darmepithel vorzufindende Lymphozytenpopulation, den intraepithelialen Lymphozyten (IELs). Auf mehr als 95 % dieser Lymphozyten findet man  $\alpha_E:\beta_7$ -Integrin und der bisher einzig identifizierte Ligand für dieses Integrin ist das epithelial exprimierte E-Cadherin.

Aufgrund der Relevanz der  $\alpha_4$ - und  $\beta_7$ -Integrine als intestinale *homing*-Rezeptoren wurden in den letzten Jahre zahlreiche Studien durchgeführt, um die Beteiligung dieser Adhäsionsmoleküle und deren Liganden an der Pathogenese verschiedener Krankheitsprozesse zu klären. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine Blockierung von  $\alpha_4$ -Integrinen oder MAdCAM-1 die Entstehung diverser entzündlicher Erkrankungen des Darms verhindern oder zumindest verbessern kann [131]. Die Verabreichung monoklonaler Antikörper gegen  $\alpha_4$ -Integrine, speziell gegen das  $\alpha_4:\beta_7$ -Integrin, führte in einem IBD-Modell an Mantelaffen zur Abschwächung der Kolitis [132]. Des Weiteren konnte unlängst gezeigt werden, dass die Behandlung von Menschen mit Natalizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen  $\alpha_4$ -Integrin, zu einer

Abschwächung der entzündlichen Aktivität von Morbus Crohn, einer Form der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, führt [133]. Die Rolle der  $\beta_7$ -Integrin Untereinheit wurde gezielt in murinen experimentellen Krankheitsmodellen untersucht. Von Picarella und Kollegen konnte 1997 gezeigt werden, dass die Verabreichung von monoklonalen Antikörpern gegen die  $\beta_7$ -Untereinheit und MAdCAM-1 in einem murinen Kolitis-Modell zu einer Reduktion der Entzündung im Darm führt [18]. In einem Maus-Transplantationsmodell von 2002 führte ebenfalls die Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen die  $\beta_7$ -Untereinheit zu einer Abschwächung der intestinalen allogenen Abstoßungsreaktion [134]. In einem Knochenmarktransplantationsmodell wurde 2006 die Rolle des  $\beta_7$ -Integrins in Bezug auf *graft-versus-host disease* (GVHD – Transplantat-Gegen-Wirt-Krankheit) näher untersucht. Die Autoren konnten zeigen, dass das Fehlen von  $\beta_7$ -Integrin auf alloreaktiven T-Zellen zu einer geringeren Morbidität und Mortalität durch GVHD führt, bedingt durch vermindertes *homing* dieser Zellen in den Darm [135].

### **Regulierung der Avidität des $\alpha_4\beta_7$ -Integrins durch die $\beta_7$ zytoplasmatische Domäne**

Bereits 1994 konnte von Crowe und Kollegen durch *in vitro* Studien die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von  $\beta_7$ -Integrin für die Avidität des  $\alpha_4\beta_7$ -Rezeptors verifiziert werden. Um die Funktion der zytoplasmatischen Domäne zu ermitteln, wurden normale und verkürzte  $\beta_7$ -Untereinheiten stabil in murine B-Zelllinien exprimiert, um mit Hilfe von Adhäsionstests die Ligandenbindungsfähigkeit der einzelnen Rezeptoren zu testen. Es konnte gezeigt werden, dass die Entfernung der kompletten zytoplasmatischen Domäne von  $\beta_7$ -Integrin weder die Fähigkeit der Oberflächenexpression des Rezeptors noch die Heterodimerbildung mit  $\alpha_4$ -Integrin beeinträchtigt. Die Eliminierung der distalen Region (bzw. der letzten 34 C-terminalen AS) zeigte in Adhäsionstests den vollständigen Verlust der Ligandenbindungsaktivität des Rezeptors. Dies deutet auf eine positiv regulatorische Funktion der distalen Region bezüglich der Ligandenbindung von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin [114]. Ähnliche Ergebnisse konnten für  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Integrine erzielt werden, in denen Mutationen in der distalen Region der zytoplasmatischen Domäne ebenfalls die Ligandenbindung beeinträchtigten sowie die Aktivierung durch Phorbol ester und Assoziation mit dem Zytoskelett verhinderten [118] [136].

Das komplette Entfernen der zytoplasmatischen Domäne von  $\beta_7$ -Integrin resultierte in der konstitutiven Expression von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf der Zelloberfläche und in hoher Avidität für alle bekannten Liganden. Im Gegensatz dazu führte das Entfernen der zytoplasmatischen Domänen von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrin zu einem Verlust der Ligandenbindungsaktivität. Die proximale Region von  $\beta_7$ -Integrin scheint daher eine dominant-negativ regulatorische Kapazität zu besitzen. Alle von Crowe und Kollegen erhobenen Daten deuten darauf hin,

dass das  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin in drei Aktivierungszuständen vorliegen kann: in einem inaktiven Zustand, in dem keiner der bekannten Liganden gebunden wird; in einem partiell aktiven Zustand (Wildtyp), in dem vorzugsweise VCAM-1, aber nicht MAdCAM-1 und Fibronektin gebunden werden; und schließlich in einem aktiven Zustand, in dem vom Rezeptor alle Liganden mit hoher Avidität gebunden werden. Diese drei Aktivierungszustände konnten auch für das Integrin  $\alpha_4\beta_1$  beschrieben werden, mit dem partiell aktiven Rezeptor, der vorzugsweise VCAM-1 als Ligand bindet [137]. Im Jahr 2006 konnte von Krissansen und Kollegen ein funktionales Motif in der zytoplasmatischen Domäne von  $\beta_7$ -Integrin identifiziert werden, welches mit FAK und src interagiert und so das *clustern* und die Adhäsion von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin kontrolliert. Bei diesem Motif handelt es sich um eine sechs AS lange CARD (*cell adhesion regulatory domain*) in der Membran-proximalen Region der  $\beta_7$ -Untereinheit (siehe Abb. 1.12). Dieses YDRREY Motif, bestehend aus einem Kern von zwei basischen Argininen (R) sowie zwei sauren AS (D und E) flankiert durch Tyrosin-Reste, findet man einzig in der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins. Dies lässt die Vermutung zu, dass die adhäsiven Funktionen des  $\beta_7$ -Integrins eventuell durch andere intrazelluläre Signalwege gesteuert werden.

$\beta 7M$	RLSVEIYDRREYRRFEKEQQQLNWKQDNNPLYKSAITTTVNPRFQGTNGRSPSLSLTREAD
$\beta 7H$	RLSVEIYDRREYSRFEKEQQQLNWKQDSNPLYKSAITTTINPRFQEADSPTL
$\beta 6$	KLLVSFHDRKEVAKFEAERSKAKWQTGTNPLYRGSTSTFKNVTYKHREKQKVDLSTDC
$\beta 5$	KLLVTIHDRREFAKFQSERSRARYEMASNPLYRKPISTHTVDFTFNKFNKSYNGTVD
$\beta 3$	KLLITIHDRKEFAKFEEERARAKWDTANNPLYKEATSTFTNITYRGT
$\beta 2$	KALIHLSDLREYRRFEKEKLKSQWNND NPLFKSATTVMNPKFAES
$\beta 1$	KLLMIIHDRREFAKFEKEKMNAKWDGTGENPIYKSAVTTVVNPKYEGK

**Abb. 1.12: Sequenzvergleich der zytoplasmatischen Region von humanem und murinem  $\beta_7$ -Integrin mit den zytoplasmatischen Regionen anderer Integrine.** Die Position der CARD-Domäne des  $\beta_7$ -Integrins, mit den flankierenden Tyrosinen ist hervorgehoben. Tyrosin-Phosphorylierungsstellen sind unterstrichen. M, Maus; H, Mensch (abgewandelt nach Krissansen [138])

### ***Phänotyp der $\beta_7$ -Integrin defizienten Maus***

Die Generierung von Mäusen, in denen das  $\beta_7$ -Integrin Gen ausgeschaltet wurde, führte zu lebensfähigen Tieren, die neben Defekten im darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT) keine Abnormalitäten aufweisen [35]. Das GALT setzt sich aus den PPs, den MLNs, den Lymphozyten der Lamina Propria (LPLs) sowie den intraepithelialen Lymphozyten (IELs) zusammen. Die Größe der PPs in  $\beta_7$ -Integrin defizienten Mäusen ist im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf 10-20 % reduziert. Diese stark verkleinerten PPs weisen zudem eine verminderte Zellularität sowie rudimentäre Follikel auf. Die Anzahl der PPs von  $\beta_7$ -Integrin Knockout Mäusen ist jedoch vergleichbar mit ihrer Anzahl in WT-Mäusen (~ 8-12) und die Reduktion in der Größe der PPs manifestiert sich erst ab Tag 3 nach der Geburt [139]. Dies deutet darauf hin, dass durch das Fehlen von  $\beta_7$ -Integrin nicht die Anlagen der PPs beeinflusst werden. Des Weiteren konnte ein 10-30facher Unterschied in der Anzahl der IgA<sup>+</sup> und IgM<sup>+</sup> B-Zellen und Plasmazellen in der Lamina Propria des Darms zwischen  $\beta_7$ -Integrin defizienten und WT-Mäusen festgestellt werden. Eine ähnliche Reduktion zeigte sich für IgM<sup>+</sup>-Zellen in den PPs sowie für CD4<sup>+</sup> Zellen in der Lamina Propria von  $\beta_7$ -Integrin Knockout Mäusen. Durch Adhäsions- und Migrationstests konnte ferner gezeigt werden, dass die Bindungsfähigkeit von  $\beta_7$ -Integrin defizienten Lymphozyten an WT-HEVs sowie die Migrationsfähigkeit dieser Lymphozyten in PPs stark beeinträchtigt ist. Weitere *in vivo* Analysen zeigten, dass  $\beta_7$ -Integrin defiziente Lymphozyten nicht in der Lage sind, an endotheliale Zellen zu adhären und dass die Rollgeschwindigkeit dieser Lymphozyten im Vergleich zum WT leicht erhöht ist. Durch das Fehlen von  $\beta_7$ -Integrin sind die Lymphozyten also zwar immer noch in der Lage am Endothel entlang zu rollen, jedoch kann eine feste Adhäsion und die nachfolgende Extravasation nicht mehr stattfinden [35].

## 1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Das Ziel dieses Projekts ist die Untersuchung der *in vivo* Funktion des Adhäsionsmoleküls  $\beta_7$ -Integrin und seines endothelialen Liganden MAdCAM-1 bei lymphozytärer Migration und Immunantwort in der Maus.

### **A: Einführung von spezifischen Mutationen in die zytoplasmatische Domäne des $\beta_7$ -Integrins**

Die zytoplasmatische Domäne der Integrine spielt, wie ausführlich beschrieben wurde, eine Schlüsselrolle in der bidirektionalen Signaltransduktion der Integrine, deren Konformation und der Ligandenaffinität.

Der  $\beta_7$ -Integrin Knockout ruft, anders als die Deletion von anderen Integrinen, weder systemische Defekte hervor, noch beeinträchtigt er die Entwicklung der Leukozyten. Lediglich das *homing* der Lymphozyten zu den PPs des GALT ist durch das Fehlen von  $\beta_7$ -Integrin auf der Lymphozytenoberfläche beeinträchtigt [35]. Daher ist die Analyse von Mutanten mit gezielten Veränderungen im  $\beta_7$ -Integrin-Gen möglich und verspricht neue Erkenntnisse über die Signaltransduktion der Integrine zu gewinnen. Von großem Interesse ist hier die Untersuchung der Rolle der zytoplasmatischen Domäne insbesondere auch im Hinblick auf zytoplasmatische Proteine, die mit  $\beta_7$ -Integrin wechselwirken und Auswirkungen auf die Integrin-vermittelte Signalweiterleitung haben könnten. In dieser Arbeit sollen mittels *gene targeting* vier unterschiedliche Mutationen in die zytoplasmatische Domäne des murinen  $\beta_7$ -Integrin Gens eingeführt werden (siehe Abb. 1.13).



**Abb. 1.13: Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins und die vier einzuführenden Mutationen**

### **I: Deletion der kompletten zytoplasmatischen Domäne von $\beta_7$ -Integrin ( $\Delta 61$ ) bzw. des C-terminalen Bereichs ( $\Delta 34$ )**

Diese beiden Mutationen sollen einen frühzeitigen Translationsstop der zytoplasmatischen Domäne verursachen. Hiermit soll festgestellt werden, welcher Bereich der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta_7$ -Untereinheit für die Einwanderung der Lymphozyten in das GALT essentiell ist und ob es in diesen Bereichen regulatorische Elemente gibt, die an der Ligandenbindungsaffinität beteiligt sind.

Es soll außerdem geklärt werden, ob die extrazelluläre sowie die Transmembran-Domäne für die Transmigration der Lymphozyten ausreichen (Heterodimer-Bildung mit  $\alpha$ -Untereinheit sollte noch möglich sein). Die Fragen, ob nur durch die  $\alpha$ -Untereinheit eine Verbindung zum Zytoskelett hergestellt werden kann und ob eine alleinige Weiterleitung von Signalen über die  $\alpha$ -Untereinheit möglich ist, sollen so geklärt werden.

### **II: Punktmutation $Y_{735}$ -A**

Bei dieser Mutation soll der Austausch von Tyrosin ( $Y_{735}$ ) mit Alanin erfolgen. Sie soll der *in vivo* Analyse Integrin-assoziiierter zytoplasmatischer Proteine dienen. 1998 wurde von Rietzler und Kollegen für das humane  $\beta_7$ -Integrin ein spezifischer Kontakt mit dem Protein WAIT-1 nachgewiesen [127]. WAIT-1 bindet ausschließlich an  $\beta_7$ -Integrine. Die Punktmutation  $Y_{735}$ -A sollte die Bindung an EED, dem murinen Homolog zu WAIT-1, verhindern und die konstitutive Aktivierung des Integrins bewirken und somit die putativ negativ regulatorische Funktion von WAIT-1 bzw. EED eliminieren.

### **III: Punktmutation $D_{736}$ -R**

Bei dieser Mutation soll Asparaginsäure ( $D_{736}$ ) gegen Arginin ausgetauscht werden, was die Anlagerung der Membran-proximalen Regionen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten verhindern sollte, wodurch ein konstitutiv aktiver Rezeptor entsteht. Die  $\beta_7$ -Integrin-vermittelte Signaltransduktion sollte jedoch immer noch möglich sein.

Hughes und Kollegen führten 1996 die entsprechende Mutation in das  $\alpha_{IIb}:\beta_3$ -Integrin ein, die zu konstitutivem *outside-in signalling* führte, gemessen am Phosphorylierungszustand von FAK [102]. Es wird angenommen, dass die Salzbrücke, die sich zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit befindet, das Integrin in einer inaktiven Konformation hält, da eine Umkehrung der Ladungen ( $\alpha_{IIb}$ :  $R_{995}D$  und  $\beta_3$ :  $D_{723}R$ ) zu einem ebenfalls inaktiven Rezeptor führt (wie Wildtyp).

Falls *outside-in signalling* auf das von  $\beta_7$ -Integrin-vermittelte Einwanderungsverhalten einen Einfluss hat, müssten Unterschiede im Migrationsverhalten der Lymphozyten im Vergleich der  $\Delta 61$  Mutation mit der  $D_{736}$ -R Mutation auftauchen.

### **B: Analyse der MAdCAM-1 defizienten Maus**

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurde in unserem Labor mittels gezieltem *gene targeting* bereits eine MAdCAM-1 defiziente Mausmutante hergestellt. Diese Mäuse sind lebensfähig, weisen keine gravierenden Defekte auf und wurden auf dem C57BL/6-Hintergrund zurück gekreuzt. Ziel dieser Dissertation ist eine detaillierte Analyse der MAdCAM-1 defizienten Mäuse, um so die Funktion dieses Adhäsionsmoleküls für die Migration von Lymphozyten zu analysieren. Mit Hilfe histologischer Techniken sollen die lymphatischen Gewebe und anhand von *in vivo* Migrationsassays das Migrationsverhalten von Lymphozyten in der MAdCAM-1 defizienten Maus untersucht werden. Des Weiteren soll mit Hilfe von Immunisierungsexperimenten eine Analyse der humoralen Immunantwort von MAdCAM-1 defizienten Mäusen erfolgen.

## 2 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Generierung und Analyse von konditionalen Mausmutanten zur Aufklärung der Funktion immunologischer Abwehrmechanismen und den daran beteiligten spezifischen Adhäsionsmolekülen. Mit Hilfe dieser Mausmutanten soll die *in vivo* Funktion des auf Lymphozyten exprimierten  $\beta_7$ -Integrins und seines endothelialen Liganden MAdCAM-1 bei lymphozytärer Migration und Immunantwort untersucht werden. Dadurch soll die spezifische Interaktion von  $\beta_7$ -Integrin und MAdCAM-1 bei den geschilderten Prozessen näher beleuchtet werden.

Für diesen Zweck sollen erstens vier verschiedene  $\beta_7$ -Integrin Mausmutanten generiert und analysiert werden, die spezifische Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta_7$ -Untereinheit aufweisen. Der Phänotyp der  $\beta_7$ -Integrin Knockout Maus beschränkt sich lediglich auf den Aufbau des GALT und das Migrationspotential von Lymphozyten. Wie schon in Abschnitt 1.4.2 der Einleitung erläutert wurde, spielt die zytoplasmatische Domäne von  $\beta$ -Integrinen eine Schlüsselrolle in der bidirektionalen Signalübertragung. Mit Hilfe dieser Mausmutanten möchten wir nun die Rolle der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins für die lymphozytäre Migration und den Aufbau des GALT untersuchen. Es soll herausgefunden werden, welche Relevanz die zytoplasmatische Domäne für die Migration von Lymphozyten hat und ob eine Signalweiterleitung durch die zytoplasmatische Domäne des  $\beta_7$ -Integrins für die lymphozytäre Migration von Bedeutung ist.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der in unserem Labor durch gezieltes *gene targeting* hergestellten MAdCAM-1-defizienten Mausmutante. Wie in Abschnitt 1.5 (B) der Einleitung beschrieben ist, wurde das murine Gen für MAdCAM-1 deletiert und homozygote Träger der Mutation hergestellt. Diese Mäuse sind lebensfähig und wurden für eine detailliertere Analyse auf den C57BL/6 Hintergrund zurück gekreuzt. Mit Hilfe der MAdCAM-1 defizienten Maus soll in dieser Arbeit die Rolle dieses Adhäsionsmoleküls während lymphozytärer Migration und Immunantwort untersucht werden.

Im folgenden Abschnitt wird nun als erstes die Herstellung der verschiedenen  $\beta_7$ -Integrin Mausmutanten vorgestellt.

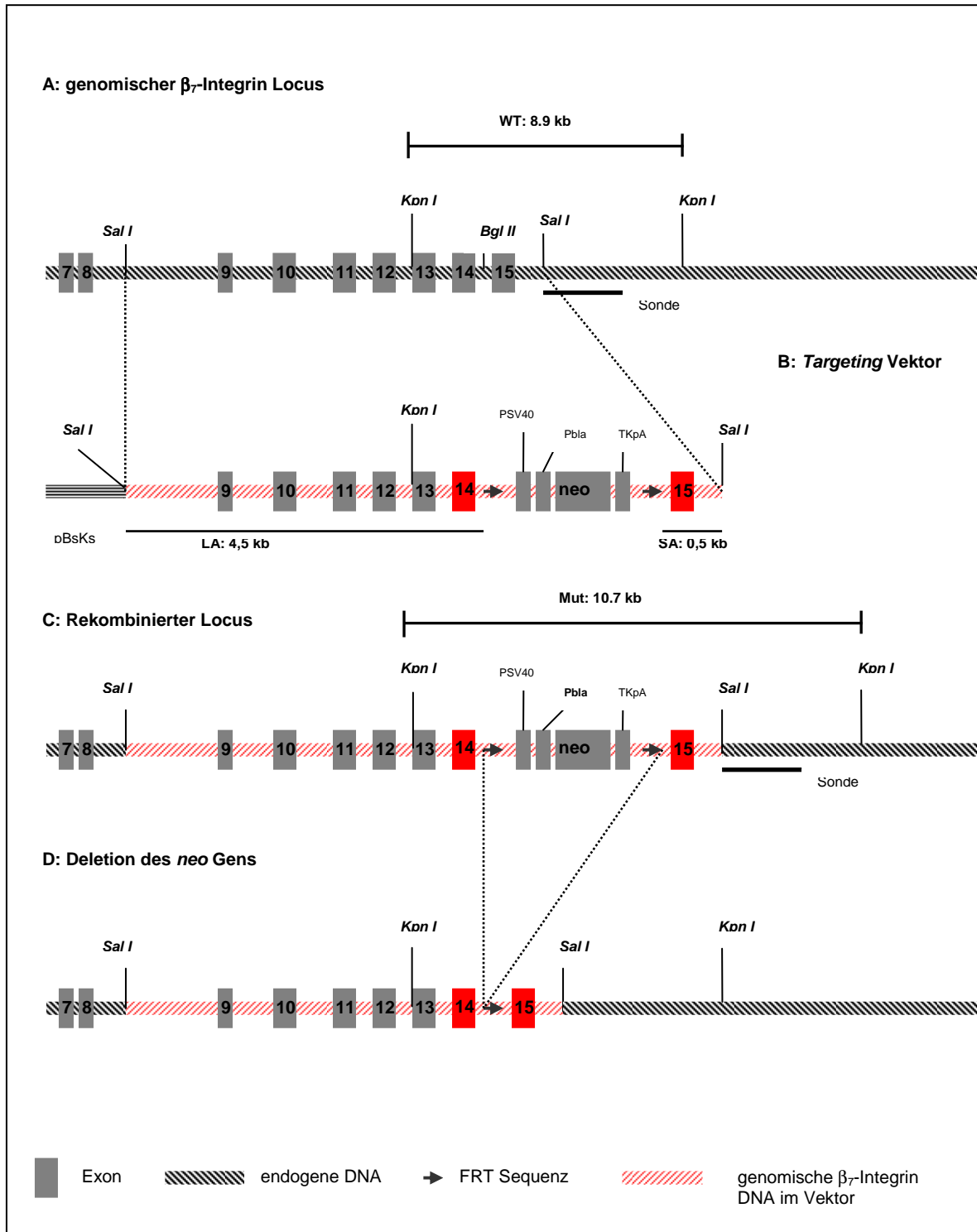


## 2.1 Generierung von Mausmutanten mit gezielten Veränderungen in der zytoplasmatischen Domäne des $\beta_7$ -Integrin Gens

Bei den vier in die zytoplasmatische Domäne des  $\beta_7$ -Integrins einzuführenden Mutationen handelt es sich um Punktmutationen, die zu Verkürzungen des Proteins ( $\Delta 61$  und  $\Delta 34$ ) oder zu einem Aminosäureaustausch (Y-A und D-R) führen sollen (siehe Einleitung Abschnitt 1.5 (A) ). Diese Mutationen sollen mit Hilfe von *gene targeting* in den murinen  $\beta_7$ -Integrin Locus eingeführt werden. Die für dieses Projekt geleisteten Vorarbeiten beinhalten die Konstruktion der vier verschiedenen *Targeting* Vektoren [140], die für die Einführung der einzelnen Mutationen in den murinen Locus durch homologe Rekombination benötigt werden.

Die Konstruktion der vier verschiedenen *Targeting* Vektoren erfolgte aus genomischer  $\beta_7$ -Integrin DNA in einem C57BL/6 Hintergrund, kloniert in einen pBlueskript®II SK<sup>+</sup> Vektor (Promega). Mit Hilfe gezielter Mutagenese wurden innerhalb der  $\beta_7$ -Integrin DNA die Mutationen  $\Delta 61$ , Y-A und D-R in Exon 14 und Mutation  $\Delta 34$  in Exon 15 eingeführt. Eine von FRT Sequenzen (*flp-recombinase recognition target*) flankierte Neomycin-Selektionskassette wurde zwischen Exon 14 und 15 inseriert, um *in vitro* eine positive Selektion homolog rekombinierter ES-Zellklone vornehmen zu können. Die Flankierung des Neomycin-Resistenzgens durch FRT Sequenzen erlaubt die spätere Deletion (*in vitro* und *in vivo*) des Resistenzgens durch Flp-vermittelte Rekombination. Abb. 2.1 veranschaulicht die *Targeting*- und Southern Blot-Strategie für die Einführung der vier verschiedenen Mutationen in die zytoplasmatische Domäne des  $\beta_7$ -Integrin Gens.

Im Rahmen dieser Dissertation soll nun die gezielte Veränderung des  $\beta_7$ -Integrin Gens durch das Einbringen der vier verschiedenen *Targeting* Vektoren in murine embryonale Stammzellen erfolgen. Durch Injektion der veränderten Stammzellen in murine Blastozysten und Reimplantation dieser Blastozysten in scheinchwangere Ammen sollen heterozygote Träger der einzelnen Mutationen hergestellt werden, die dann untereinander bis zur Homozygotie verpaart werden, so dass das *in vivo* Studium des veränderten Gens ermöglicht wird.



**Abb. 2.1: Targeting Strategie und Southern Blot Strategie für die gezielte Mutagenese der zytoplasmatischen Domäne des murinen  $\beta_7$ -Integrin Gens.**

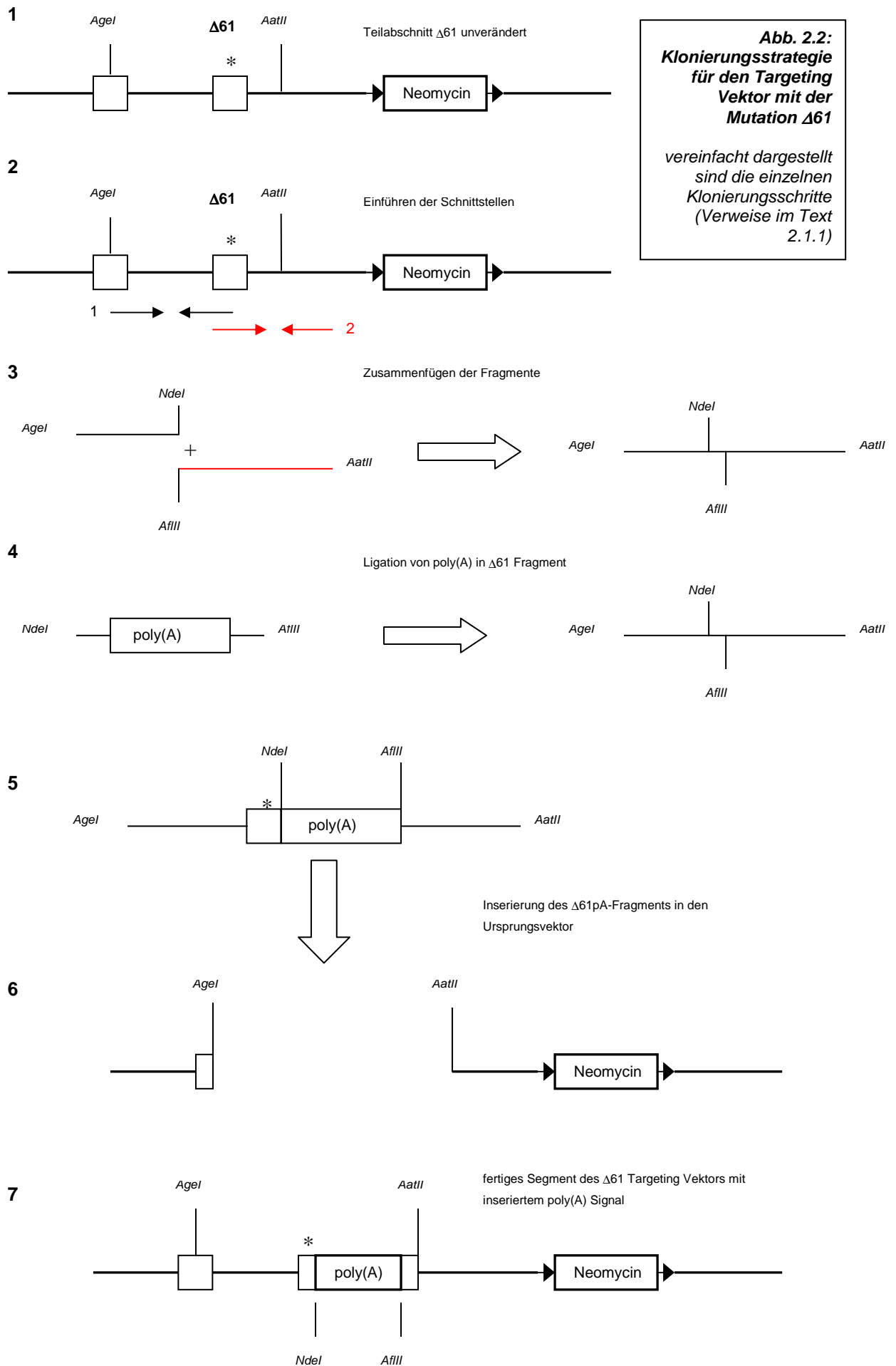
(A) zeigt den genomischen  $\beta_7$ -Integrin Locus mit den Exonen 7-15; (B) zeigt den Targeting Vektor, mit den Mutationen  $\Delta 61$ , Y-A und D-R in Exon 14 (rot) und Mutation  $\Delta 34$  in Exon 15 (rot); (C) zeigt den rekombinierten  $\beta_7$ -Integrin Locus; (D) zeigt den rekombinierten Locus nach Flp-vermittelter Deletion des neo-Resistenzgens;

WT – Wildtyp, Mut – mutiert, pBsKs – pBlueskript Vektor, PSV40 – SV40 Promotor, Pbla –  $\beta$ -Lactamase Promotor, neo – Neomycin Resistenzgen, TkpA – Thymidinkinase-poly-Adenylierungssequenz, LA – long arm of homolgy (langer Arm der Homologie), SA – short arm of homology (kurzer Arm der Homologie), frt – flp recognition target (Flp Rekombinase Erkennungssequenz)

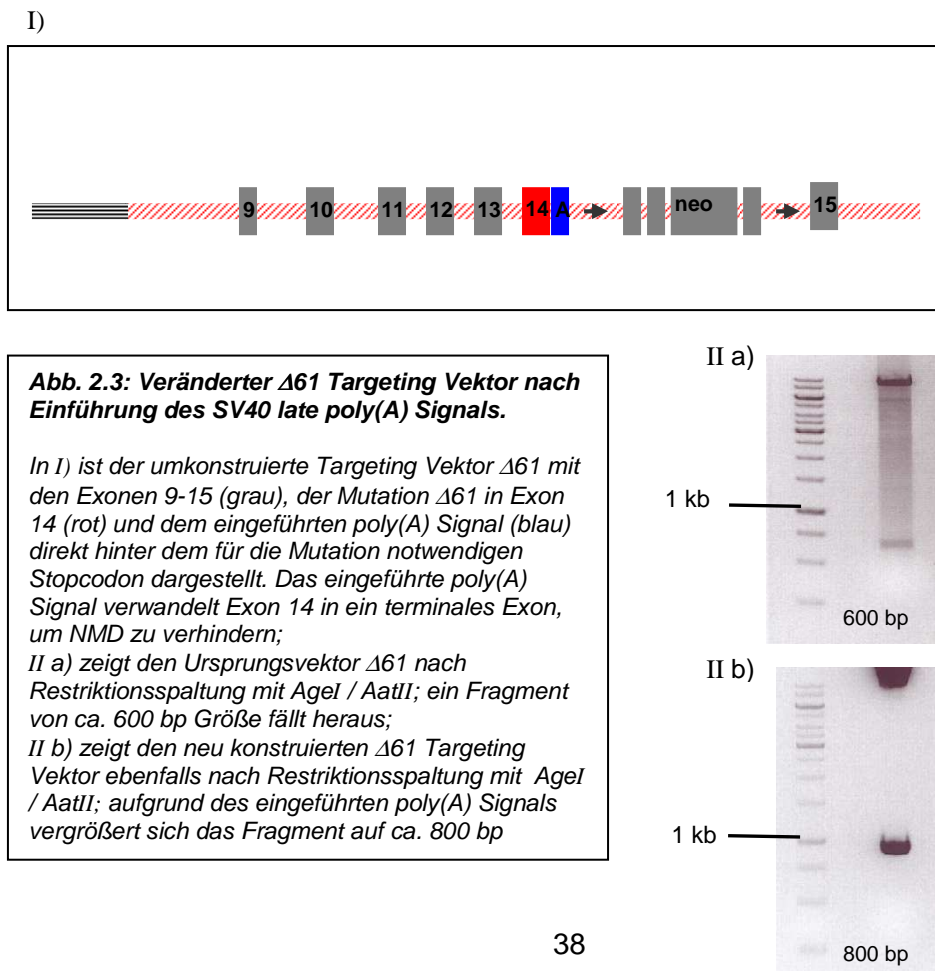
### 2.1.1 Umkonstruktion des *Targeting* Vektors mit der Mutation $\Delta 61$

In der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass die erfolgreiche Etablierung der Mutation  $\Delta 61$  und die anschließende Analyse der Mausmutanten mit dem oben dargestellten *Targeting* Vektor nicht möglich ist. Wir konnten herausfinden, dass es vermutlich aufgrund der Lage des eingeführten Stopcodons für die Mutation  $\Delta 61$  zu einem Abbau der gesamten  $\beta_7$ -Integrin mRNA kommt. Dieser als NMD (*nonsense mediated mRNA decay*) ursprünglich in der Hefe identifizierte Prozess bewirkt den post-transkriptionalen Abbau von mRNA mit darin enthaltenden vorzeitigen Stopcodons (PTCs – *premature translation-termination codons*) [141] [142]. Ein Translationsstopcodon wird i.A. als normal identifiziert, wenn mehr als 50 Nukleotide stromabwärts kein Intron folgt. Die meisten normalen Stopcodons befinden sich im terminalen Exon, wohingegen NMD-aktivierende PTCs für gewöhnlich weiter stromaufwärts lokalisiert sind [143]. Nach Untersuchung der mutierten  $\Delta 61$  Sequenz stellte sich heraus, dass das eingeführte Stopcodon 78 Nukleotide stromaufwärts der nächsten Exon-Exon Verbindung liegt. Aufgrund dieser Tatsache nehmen wir an, dass der NMD-Prozess die Ursache für den Abbau der gesamten  $\beta_7$ -Integrin mRNA ist. Vermutlich wird das benötigte Stopcodon von den Proteinen der NMD-Maschinerie als vorzeitiges Stopcodon erkannt, es erfolgt der NMD-vermittelte Abbau der gesamten  $\beta_7$ -Integrin mRNA und das verkürzte  $\beta_7$ -Integrin wird nicht exprimiert. Um Mausmutanten mit der Mutation  $\Delta 61$  zu erzeugen, musste der hierfür notwendige *Targeting* Vektor umkonstruiert werden. Die Umkonstruktion des *Targeting* Vektors, um NMD zu verhindern, umfasst die Einführung eines poly(A) Signals an die Position des Stopcodons. Das poly(A) Signal bewirkt die frühzeitige Termination des  $\beta_7$ -Integrin Transkripts, indem es Exon 14 mit der enthaltenden Mutation  $\Delta 61$  in ein terminales Exon verwandelt. Somit sollte der nach der Transkription stattfindende Abbau der  $\beta_7$ -Integrin mRNA durch NMD verhindert werden. Als poly(A) Signal wurde das SV40 *late* poly(A) Signal gewählt, da es als besonders starker Terminator der Transkription gilt (persönliche Kommunikation Dr. Martin Hafner). Die Isolierung des SV40 *late* poly(A) Signals erfolgte aus dem Plasmid pGL3-*Promotor* von Promega. Bevor jedoch das poly(A) Signal in den Vektor inseriert werden konnte, musste das *Targeting* Konstrukt mit entsprechenden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen versehen werden. Dazu wurden als erstes zwei PCRs (siehe Material und Methoden Punkt 5.6.12.6) zum Einführen der Schnittstellen *NdeI* und *AflIII* in den Vektor  $\Delta 61$  durchgeführt. Die beiden Amplifikate (150 bp und 600 bp) dienten nun in einer dritten PCR als Matrize und wurden mit den Primern *Agel*sense<sup>5</sup> und *AatII*antisense<sup>6</sup> zusammengefügt. Dieses neu entstandene Fragment, flankiert von den Schnittstellen *Agel* und *AatII*, wurde in den Klonierungsvektor pCR4-TOPO<sup>®</sup> inseriert.

## 2 Ergebnisse

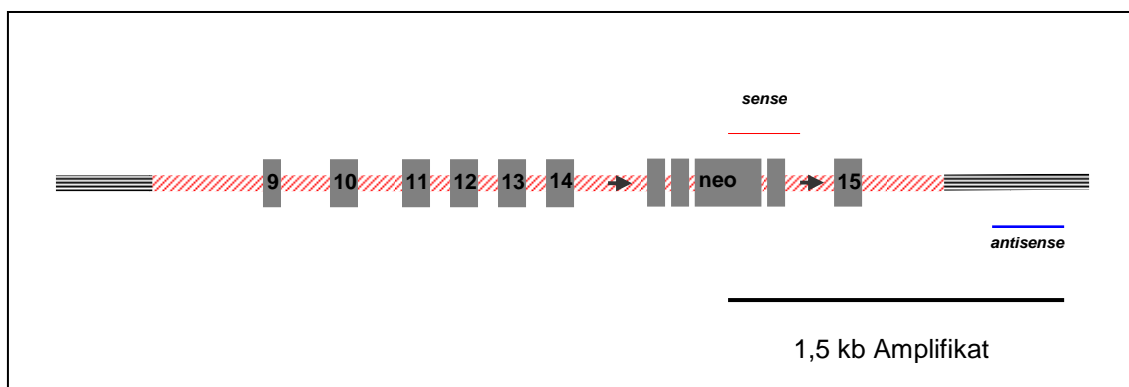


Die Einführung der Schnittstellen *NdeI* und *AflII* in den *Targeting* Vektor  $\Delta 61$  diente dem späteren Inserieren des poly(A) Signals. Nach Amplifizierung des poly(A) Signals aus pGL3 mit den Primern Poly(A)*NdeI*sense<sup>15</sup> und Poly(A)*AflII*antisense<sup>16</sup> (siehe Material und Methoden Punkt 5.6.12.7) wurde dieses ebenfalls in den Klonierungsvektor pCR4-TOPO<sup>®</sup> eingefügt. Zum Inserieren des poly(A) Signals (flankiert von *NdeI* und *AflII*) in das veränderte  $\Delta 61$ -Segment, wurde dieses nach Restriktionsspaltung isoliert, aufgereinigt und in das ca. 600 bp große  $\Delta 61$ -Fragment in pCR4-TOPO<sup>®</sup> (nach Restriktionsspaltung ebenfalls isoliert und aufgereinigt) ligiert. Dieses ca. 800 bp große Fragment, welches von *AgeI* und *AatII* flankiert ist und das poly(A) Signal (flankiert von *NdeI* und *AflII*) enthält, wurde schließlich nach Isolierung aus pCR4-TOPO<sup>®</sup> in den  $\Delta 61$  *Targeting* Vektor (nach Restriktionsspaltung mit *AgeI* / *AatII*, Isolierung und Aufreinigung) eingefügt. Die erfolgreiche Inserierung der veränderten Teilsequenz in den *Targeting* Vektor  $\Delta 61$  wurde durch Restriktionsanalysen überprüft und durch Sequenzierungen (Sequenzierung durchgeführt in der Abteilung Genomanalyse am HZI) bestätigt. Abbildung 2.2 zeigt zusammenfassend eine schematische Darstellung der einzelnen Klonierungsschritte. Abbildung 2.3 zeigt eine grafische Darstellung des fertigen  $\Delta 61$ poly(A) *Targeting* Vektors sowie eine Restriktionsanalyse des  $\Delta 61$ poly(A) Konstrukts.



### 2.1.2 Transfektion der *Targeting* Vektoren in murine embryonale Stammzellen und Detektion von homologer Rekombination mittels Southern Blot und PCR

Die Transfektion aller *Targeting* Vektoren erfolgte in IB10.1 und F1 ES-Zellen. Dafür wurden die Vektoren zuvor mit *XhoI* linearisiert und wie unter Material und Methoden Punkt 5.5.4 beschrieben für die Transfektion von ES-Zellen eingesetzt. Pro Transfektion wurden ca. 300-600 Klone gepickt, expandiert, Replikate eingefroren und parallel die DNA der Klone mit Hilfe von PCR und Southern Blot analysiert (siehe Material und Methoden Punkte 5.5.5 – 5.5.6, 5.5.9 und 5.6.10 - 5.6.12). Für den Nachweis der homologen Rekombination mittels Southern Blot wurde die genomische ES-Zell DNA zunächst mit *KpnI* verdaut, in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und schließlich für die Hybridanalyse auf eine Nylonmembran geblottet. Nach der Restriktion mit *KpnI* hebt die in Abb. 2.1 (a) und (c) dargestellte externe Sonde ein Fragment hervor, das bei erfolgreicher Rekombination um 1,8 kb größer ist als das entsprechende WT-Fragment. Da sich die Analyse von ES-Zellklonen mittels Southern Blot als sehr zweitaufwendig erwiesen hat, wurde parallel eine PCR-Strategie entwickelt, die die schnellere Detektion homolog rekombinierter ES-Zellklone ermöglicht. Die Grundlage für diese PCR (siehe Material und Methoden Punkt 5.6.12.1) bilden ein spezifischer *sense*-Primer welcher sich im Neomycin-Resistenzgen befindet und ein spezifischer *antisense*-Primer, der im genomischen Locus außerhalb der Vektorsequenz lokalisiert ist. Nach erfolgreicher Rekombination des *Targeting* Vektors mit dem genomischen  $\beta_7$ -Integrin Locus wird ein Produkt von 1,5 kb Größe amplifiziert. Aufgrund der Position des *antisense*-Primers kann die ortsspezifische Integration des *Targeting* Konstrukts nachgewiesen werden. Abb. 2.4 veranschaulicht grafisch die PCR-Strategie für die Detektion homolog rekombinierter ES-Zellklone im  $\beta_7$ -Integrin Locus.



**Abb. 2.4: PCR-Strategie zum Nachweis homolog rekombinierter ES-Zellklone im  $\beta_7$ -Integrin Locus.**

Die Strategie basiert auf einem *sense-Primer* im Neomycin-Resistenzgen und einem *antisense-Primer* im genomischen Locus außerhalb der Targeting Vektorsequenz. Nach homologer Rekombination mit dem genomischen Locus wird ein 1,5 kb großes Produkt amplifiziert.

## 2 Ergebnisse

Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht von allen durchgeführten Transfektionen der *Targeting* Vektoren, sowie die Anzahl der detektierten homolog rekombinierten ES-Zellklone.

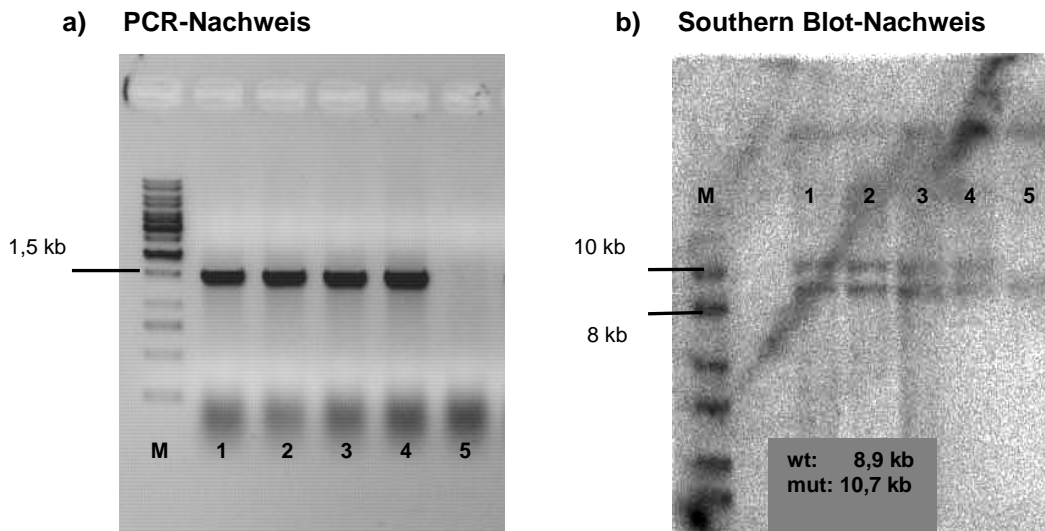
<i>Targeting</i> Vektor	$\Sigma$ analysierte Klone	$\Sigma$ homolog rekombinierte Klone	Rekombinationseffizienz
D-R	IB10.1: 1032 F1: 1764	IB10.1: <b>1</b> F1: <b>7</b>	IB10.1: 0,096 % F1: 0,4 %
$\Delta 34$	IB10.1 : 400 F1 : 1383	IB10.1 : 0 F1 : <b>4</b>	IB10.1 : / F1 : 0,3 %
Y-A	IB10.1 : 809 F1: 1280	IB10.1: 0 F1: <b>1</b>	IB10.1: / F1: 0,08 %
$\Delta 61pA$	F1: 600	F1: <b>6</b>	F1: 1 %
	<b>Gesamtanzahl analysierter Klone: 7268</b>	<b>Gesamtanzahl homolog rekombinierter Klone: 19</b>	

**Tab. 2.1: Übersicht der Transfektionen aller *Targeting* Vektoren, sowie Anzahl detektierter homolog rekombinierter ES-Zellklone und die daraus resultierende Rekombinationseffizienz.**

In **rot** sind die ES-Zellklone dargestellt, die mittels Southern Blot detektiert werden konnten und in **blau** die mit Hilfe von PCR detektiert wurden.

Wie aus Tabelle 2.1 hervorgeht, wurden von allen Transfektionen insgesamt 7268 Klone analysiert, wobei sich 19 ES-Zellklone als positiv herausstellten. Für die Mutationen D-R,  $\Delta 34$  und  $\Delta 61pA$  konnten mehrere positive F1 ES-Zellklone gefunden werden, für die Mutation Y-A nur ein Klon. Die Detektion der positiven F1 ES-Zellklone erfolgte mittels der in Abb. 2.3 vorgestellten PCR; zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde zusätzlich für jeden positiven Klon der Nachweis für homologe Rekombination mittels Southern Blot erbracht. Abb. 2.5 zeigt exemplarisch für fünf ES-Zellklone den Nachweis für homologe Rekombination sowohl mittels der oben vorgestellten PCR als auch mit Southern Blot. Bei erfolgter homologer Rekombination des *Targeting* Vektors mit dem genomischen  $\beta_7$ -Integrin Locus wird in der PCR ein Produkt von 1,5 kb Größe amplifiziert (Abb. 2.5 (a) Klone 1-4), bei nicht-stattgefundener Rekombination ist in der PCR kein Produkt zu erwarten (Abb. 2.5 (a) Klon 5). Der Nachweis homologer Rekombination im Southern Blot führt zur Detektion des WT-Fragments mit einer Größe von 8,9 kb sowie zur Detektion des mutierten Fragments mit einer Größe von 10,7 kb. Homolog rekombinierte ES-Zellklone, die heterozygote Träger des mutierten Allels sind, weisen daher im Southern Blot zwei Banden auf (Abb. 2.5 (b) Klone 1-4), wohingegen bei negativen Klonen nur das WT-Fragment detektiert wird (Abb. 2.5 (b) Klon 5).





**Abb. 2.5: Nachweis homologer Rekombination der Targeting Vektoren in ES-Zellen mittels a) PCR und b) Southern Blot.**

*In a) ist der Nachweis homologer Rekombination mittels PCR gezeigt; bei erfolgreicher homologer Rekombination wird ein Produkt von 1,5 kb Größe amplifiziert; in b) ist der Nachweis homologer Rekombination mittels Southern Blot gezeigt: die Einführung des Neomycin-Resistenzgens verlängert das WT-Fragment um 1,9 kb von 8,9 kb auf 10,7 kb. In den Spuren 1-4 in a) und b) sind homolog rekombinierte ES-Zellklone zu sehen, die heterozygote Träger des mutierten Allels sind; in Spur 5 ist ein negativer Zellklon zu sehen; M – Marker*

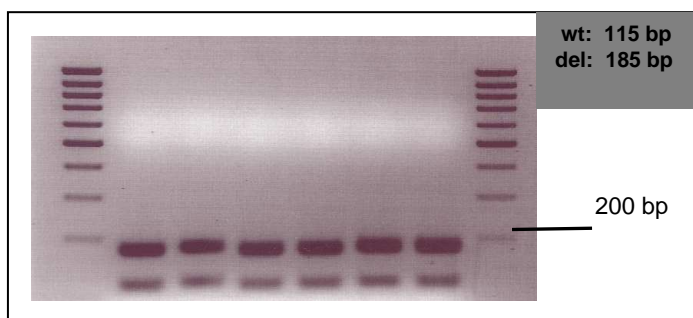
Alle vier in der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins lokalisierten Mutationen konnten erfolgreich in ES-Zellen etabliert werden, so dass diese veränderten ES-Zellen für das weitere Vorgehen für die Generierung der einzelnen Mausmutanten dienten.

Für diesen Zweck wurden alle positiven Klone revitalisiert, expandiert (siehe Material und Methoden Punkt 5.5.7) und erneut im Southern Blot auf das Vorhandensein des mutierten Allels überprüft. Konnte auch für die expandierten ES-Zellklone der Southern Blot Nachweis erbracht werden, wurden diese Zellen schließlich für die Blastozysteninjektion und den anschließenden Transfer in Ammentiere für die Erzeugung von chimären Mäusen verwendet.

### 2.1.3 Flp Rekombinase-vermittelte *in vitro* Deletion des Neomycin-Resistenzgens

Für die positive *in vitro* Selektion von ES-Zellen wurde in alle vier *Targeting* Vektoren eine Neomycin-Resistenzkassette eingeführt (siehe Abb. 2.1). Es handelt sich hierbei um einen der gebräuchlichsten Resistenzmarker, der den potentiell homolog rekombinierten ES-Zellen Resistenz gegenüber G418 verleiht und somit eine positive Selektion ermöglicht [144]. Da sich die Präsenz des Resistenzmarkers auf die Genexpression auswirken kann, sollte der Selektionsmarker nach erfolgreicher homologer Rekombination mit Hilfe einer Rekombinase entfernt werden. Um den Resistenzmarker mit einer Rekombinase entfernen zu können wurde dieser mit FRT Sequenzen flankiert.

Hierbei handelt es sich um spezifische gleichgerichtete Sequenzen, die von der Flp Rekombinase erkannt werden. Mittels der Rekombinase wird das Resistenzgen und die beiden inneren Hälften der FRT Sequenzen deletiert, und die äußeren Hälften dieser Sequenzen werden zu einer im Mausgenom verbleibenden Rekombinationssequenz zusammengefasst [145] [146]. Die Flp-vermittelte Deletion des Neomycin-Resistenzgens kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erfolgen. Die *in vitro* vermittelte Deletion erfolgt durch eine transiente Plasmid-vermittelte Rekombinase Expression in homolog rekombinierten ES-Zellklonen. *In vivo* wird die Deletion des Neomycin-Resistenzgens durch die Verpaarung chimärer Tiere mit sogenannten Flp-Deletermäusen erreicht. Diese Mäuse exprimieren die Flp Rekombinase unter einem Oozyten-spezifischen Promotor, woraufhin das Neomycin-Resistenzgen in der Eizelle deletiert wird [144]. Um die zeitaufwendige Verpaarung von chimären Tieren mit Flp-Deletermäusen zu vermeiden, wurde für die Mehrzahl der in Tab. 2.1 aufgeführten homolog rekombinierten ES-Zellklonen eine *in vitro* Deletion des Neomycin-Resistenzgens durchgeführt. Durch eine Transfektion der positiven ES-Zellklone mit einem Flp-exprimierenden Plasmid erfolgt die transiente Expression der Rekombinase in diesen Zellen und die damit verbundene Deletion des vorhandenen Neomycin-Resistenzgens. Die genaue Durchführung der Transfektion von homolog rekombinierten ES-Zellen mit dem Flp-Plasmid ist Punkt 5.5.8 im Abschnitt Material und Methoden zu entnehmen. Der Nachweis für Flp-vermittelte *in vitro* Deletion des Neomycin-Resistenzgens wurde durch eine PCR erbracht. Diese *NeoDel*-PCR (siehe Material und Methoden Punkt 5.6.12.2) basiert auf der Amplifizierung der im Mausgenom verbleibenden Rekombinationssequenz nach Flp-vermittelter Deletion. Bei nicht erfolgter Deletion wird ein Produkt von 116 bp amplifiziert; bei erfolgter Deletion vergrößert sich das Produkt um die im Genom verbliebene Rekombinationssequenz auf 185 bp. Bei homolog rekombinierten ES-Zellklonen, in denen das Neomycin-Resistenzgen deletiert werden konnte, werden daher in der PCR beide Produkte amplifiziert, da sie heterozygote Träger der jeweiligen Mutation sind. Abb. 2.6 zeigt das Ergebnis einer *NeoDel*-PCR von Flp-transfizierten ES-Zellen.



**Abb. 2.6: *NeoDel*-PCR von Flp-transfizierten ES-Zellen.**

Dargestellt ist das Ergebnis für sechs ES-Zellklone, in denen eine Flp-vermittelte Deletion des Neomycin-Resistenzgens erzielt werden konnte.

Tab. 2.2 zeigt eine Übersicht der an homolog rekombinierten ES-Zellklonen vorgenommenen *in vitro* Deletionen des Neomycin-Resistenzgens durch das Flp-Plasmid.

Klonbezeichnung	Erfolgte <i>in vitro</i> Deletion des Neomycin-Resistenzgens	Erfolgte Blastozysteninjektion
Δ34 C12	-	-
D-R D6	+	+
D-R D9	-	-
Δ61pA A8	+	+
Δ61pA E8	+	+
Y-A B3	+	+

**Tab. 2.2: Übersicht der an homologen ES-Zellklonen erzielten *in vitro* Deletionen des Neomycin-Resistenzgens durch transiente Transfektion des Flp-Plasmids.**

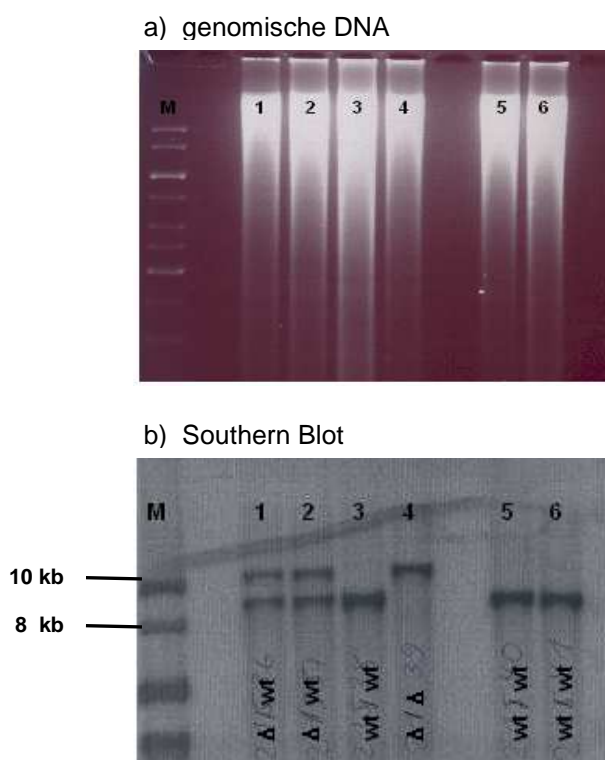
Wie aus Tab. 2.2 hervorgeht konnte für vier Klone mit den Mutationen D-R, Δ61pA und Y-A eine *in vitro* Deletion des Neomycin-Resistenzgens durch das Flp-Plasmid erzielt werden. Diese Klone wurden für die Blastozysteninjektion verwendet, was eine spätere zeitaufwendige Verpaarung mit Flp-Deletermäusen ersparte. Für den Klon Δ34 C12 war die *in vitro* Deletion des Resistenzgens nicht erfolgreich. Daher wurde dieser Klon, sowie weitere Δ34 Klone mit dem noch vorhandenen Neomycin-Resistenzgen für die Blastozysteninjektion eingesetzt.

### 2.1.4 Generierung von Mausmutanten mit spezifischen Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne des β<sub>7</sub>-Integrins

Die Grundlage für die Generierung von Mausmutanten mittels *gene targeting* sind genetisch veränderte ES-Zellen, die heterozygote Träger der jeweiligen Mutation sind. Diese veränderten ES-Zellen werden in die innere Zellmasse von murinen Blastozysten injiziert und diese in scheinschwangere Ammentiere reimplantiert. Die hierbei entstehenden chimären Tiere haben sich aus Zellen entwickelt, die zum Teil Abkömmlinge der injizierten veränderten ES-Zellen und zum Teil Abkömmlinge der ursprünglichen Blastozysten-Zellen sind. Die injizierten ES-Zellen können aufgrund ihrer Pluripotenz an der Entwicklung jedes Organs der Maus teilnehmen und somit auch zu Keimzellen werden. Falls die manipulierten ES-Zellen in die Keimbahn der chimären Tiere gelangt sind, erhält man nach der Verpaarung der chimären Tiere mit dem Wildtyp Nachkommen, die heterozygot für das modifizierte Gen sind [144] [147].

## 2 Ergebnisse

Wie bereits in Abschnitt 2.1.2 zusammengefasst wurde, konnten alle in der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins lokalisierten Mutationen erfolgreich in F1 ES-Zellen eingeführt werden. Für einige der Klone konnte außerdem vorab eine *in vitro* Deletion des Neomycin-Resistenzgens erzielt werden, was eine spätere Verpaarung der chimären Tiere mit Flp-Deletermäusen ersparte. Für das weitere Vorgehen wurden sowohl die veränderten ES-Zellen ohne Neomycin-Resistenzgen als auch mit noch vorhandenem Neomycin-Resistenzgen für die Blastozysteninjektion und den anschließenden Transfer in scheinschwangere Ammentiere verwendet (technische Durchführung: Maria Ebel, Technische Assistentin). Die chimären Tiere wurden dann für die Rückkreuzung mit C57BL/6 Mäusen oder Flp-Deletermäusen verwendet, um zu überprüfen, ob die genetisch veränderten ES-Zellen an der Keimbahnzellenentwicklung beteiligt sind und somit die jeweilige Mutation an die Nachkommen vererbt werden kann. Für die Analyse der Nachkommen aus den Rückkreuzungen wurde genomische DNA aus Mausschwanzspitzen isoliert (siehe Material und Methoden Punkt 5.6.3). Der Nachweis für die Weitergabe des modifizierten  $\beta_7$ -Integrin Gens erfolgte mittels Southern Blot (siehe Material und Methoden Punkt 5.6.10 – 5.6.11) und PCR (siehe Material und Methoden Punkt 5.6.12.2). Konnten die Nachkommen aus den Rückkreuzungen als heterozygote Träger der jeweiligen Mutation identifiziert werden, wurden diese Tiere untereinander bis zur Homozygotie verpaart. Abb. 2.7 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Southern Blots für die Genotypisierung der Mäuse.

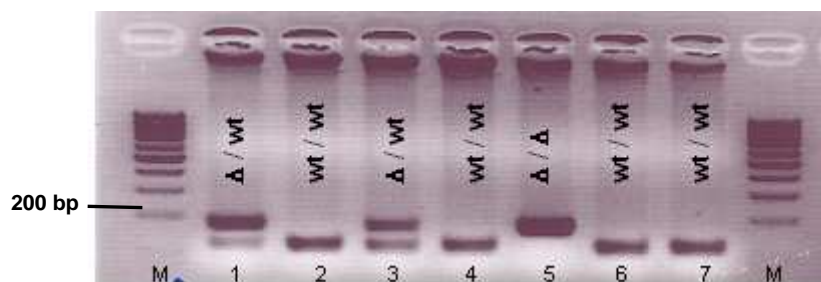


**Abb. 2.7: Genotypisierung der Mausmutanten mittels Southern Blot.**

In a) ist aufgetrennte genomische DNA dargestellt. b) zeigt das Ergebnis des dazugehörigen Southern Blots. Für WT-Mäuse ( $wt/wt$ ) wird ein Fragment von 8,9 kb Größe detektiert (Spuren 3, 5 und 6); für heterozygote Mäuse ( $\Delta/wt$ , Spuren 1 und 2) wird zusätzlich ein Fragment von 10,7 kb detektiert; homozygote Mäuse ( $\Delta/\Delta$ , Spur 4) tragen auf beiden Allelen die Mutation und zeigen daher im Southern Blot ein Fragment von 10,7 kb Größe. M - Marker

## 2 Ergebnisse

Die Genotypisierung mittels des in Abb. 2.7 dargestellten Southern Blots wurde für die Mausmutanten der Linie  $\Delta 34$  B11 vorgenommen (siehe Tab. 2.3). Diese Mausmutantenlinie war die erste, die während der vorliegenden Dissertation etabliert wurde und die Mäuse dieser Linie tragen in ihrem Genom noch das eingeführte Neomycin-Resistenzgen. Eine Genotypisierung mittels der vorgestellten *NeoDel*-PCR (siehe Material und Methoden Punkt 5.6.12.2) war nicht möglich, da diese PCR auf der verbleibenden Rekombinationssequenz nach erfolgter Flp-vermittelter Deletion des Neomycin-Resistenzgens basiert. Durch die Verpaarung heterozygoter  $\Delta 34$  B11-Mausmutanten mit Flp-Deletermäusen wurde jedoch später die Linie  $\Delta 34$  B11 x flp generiert, die *in vivo* durch Flp-vermittelte Deletion das Neomycin-Resistenzgen verloren haben. Diese Tiere wurden mit Hilfe von PCR genotypisiert. Abb. 2.8 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer PCR zur Genotypisierung der Mausmutanten.



**Abb. 2.8: Ergebnis der *NeoDel*-PCR zur Genotypisierung der Mausmutanten.**

Bei WT-Tieren (wt/wt, Spuren 2, 4, 6 und 7) wird ein Produkt von 115 bp amplifiziert; bei  $\Delta$ /wt-Tieren (Spuren 1 und 3) zusätzlich ein Produkt von 185 bp;  $\Delta$ / $\Delta$ -Tiere (Spur 5) zeigen ein Produkt von 185 bp. M - Marker

Tabelle 2.3 zeigt eine Übersicht über alle injizierten ES-Zellklone, erfolgte Keimbahntransmission sowie daraus etablierter Mausmutantenlinien in der vorliegenden Dissertation. Anzumerken ist, dass aus dem Klon Y-A B3 (siehe Tab. 2.2) nach Flp-vermittelter Deletion des Neomycin-Resistenzgens vier Klone detektiert werden konnten, die alle für Blastozysteninjektionen verwendet wurden (siehe Tab. 2.3).

## 2 Ergebnisse

Injizierte Klone	Keimbahntransmission	Etablierte homozygote Mauslinie	
Δ34 C12	-	/	
Δ34 G5	+	nach Flp-Deleterverpaarung: Δ34 Δ/Δ	
Δ34 B11	+	Δ34 Δ/Δ mit Neo	nach Flp-Deleter- verpaarung: Δ34 Δ/Δ ohne Neo
D-R D6	-	/	
D-R C5	+	nach Flp-Deleterverpaarung: D-R Δ/Δ	
D-R A8	-	/	
Δ61pA A10	-	/	
Δ61pA G3	-	/	
Δ61pA B11	-	/	
Δ61pA E8	-	/	
Δ61pA D7 flp	-	/	
Δ61pA D1 flp	+	Δ61pA Δ/Δ	
Δ61pA D5 flp	+	Δ61pA Δ/Δ	
Y-A K11 flp	Rückkreuzung / wird getestet	/	
Y-A K12 flp	Rückkreuzung / wird getestet	/	
Y-A K13 flp	Rückkreuzung / wird getestet	/	
Y-A K15 flp	Rückkreuzung / wird getestet	/	

**Tab. 2.3: Übersicht aller injizierter ES-Zellklone und der daraus etablierten Mausmutantenlinien.**

Für die gelb-markierten Klone konnten homozygote Mausmutantenlinien generiert werden;  
 Δ/Δ - homozygot für die Mutation, C12, G5 etc. Koordinaten des jeweiligen Klons auf einer  
 96-Loch-Platte, 'flp' hinter der Klonbezeichnung – Neo-Resistenzgen wurde *in vitro* deletiert.

Aus der Tabelle geht hervor, dass für die Generierung der vier verschiedenen β<sub>7</sub>-Integrin Mausmutanten insgesamt 17 genetisch veränderte ES-Zellklone für die Blastozysteninjektion verwendet wurden. Für fünf der insgesamt 17 injizierten ES-Zellklone konnte Keimbahntransmission nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um zwei ES-Zellklone mit der Mutation Δ34, zwei mit der Mutation Δ61 und einem Klon mit der Mutation D-R. Durch Heterozygotenverpaarungen konnten Mauslinien erzeugt werden, die homozygot sind für die Mutationen Δ34, Δ61 und D-R. Die chimären Tiere, die aus Blastozysteninjektionen der ES-Zellklone Δ34 G5, Δ34 B11 und D-R C5 hervorgegangen sind, wurden direkt mit Flp-Deletermäusen verpaart, um eine Deletion des noch vorhandenen Neomycin-Resistenzgens zu erzielen. Bei den chimären Tieren mit der Mutation Δ61 war eine Verpaarung mit Flp-Deletermäusen nicht notwendig, da bei diesen Klonen vorab eine *in vitro* Deletion des Neomycin-Resistenzgens erzielt werden konnte. Hier erfolgte die Rückkreuzung mit C57BL/6 Mäusen. Für die vier injizierten Y-A



Klone, bei denen ebenfalls die *in vitro* Deletion des Resistenzgens erzielt wurde, konnte bis jetzt keine Keimbahntransmission nachgewiesen werden. Die chimären Tiere aus den Blastozysteninjektionen sitzen z.Zt. in Rückkreuzung mit C57BL/6 Wildtypmäusen und eventuelle Nachkommen dieser Verpaarungen werden mittels PCR genotypisiert.

Im folgenden Abschnitt werden Ergebnisse der ersten Analysen von homozygoten Mausmutanten vorgestellt, die einen gemischten genetischen Hintergrund besitzen.

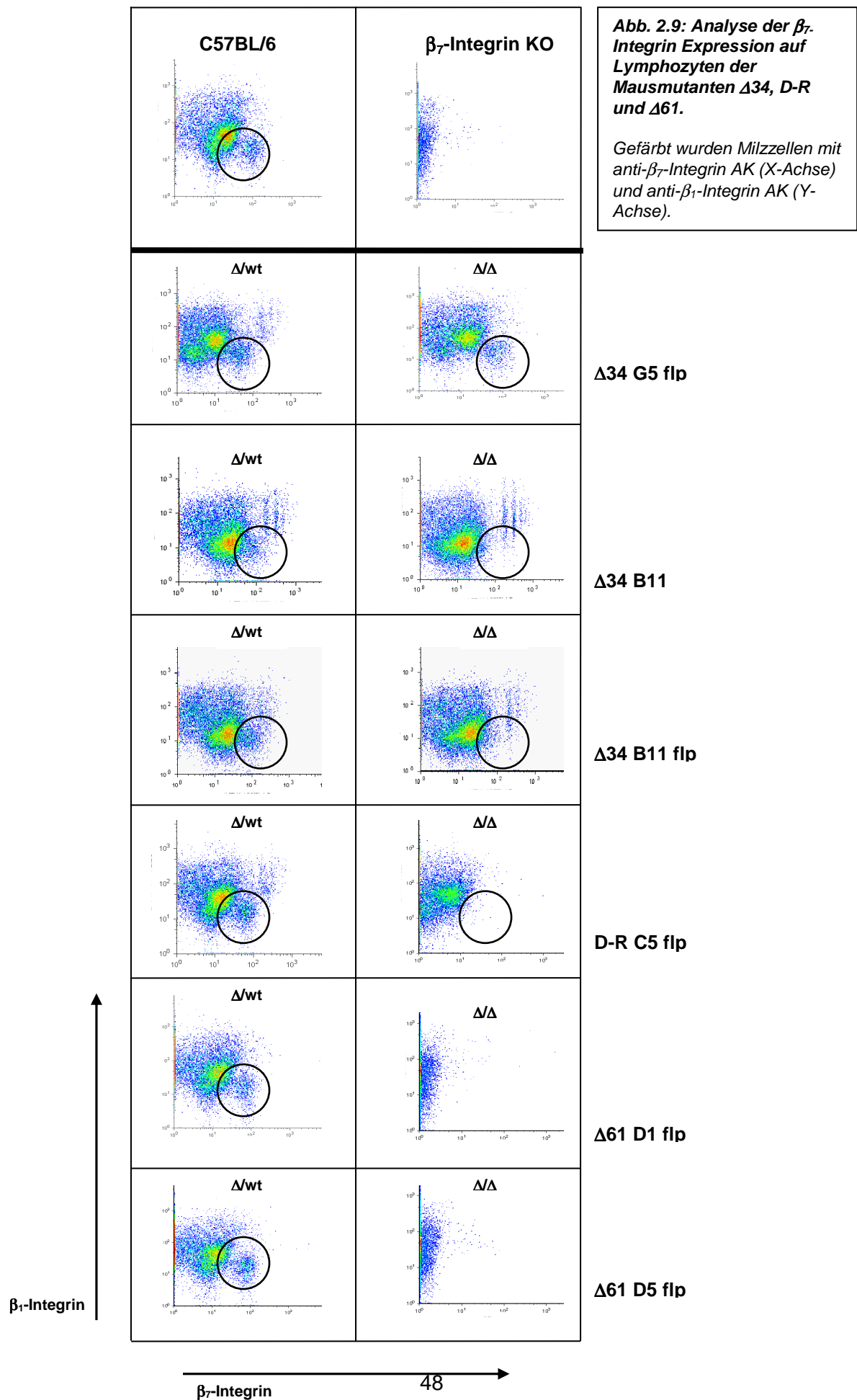
### **2.2 Analyse von Mausmutanten mit gezielten Veränderungen im $\beta_7$ -Integrin Gen**

Im Rahmen dieser Dissertation konnten fünf homozygote Mausmutantenlinien generiert werden, die spezifische Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins aufweisen. Die erfolgreich generierten Mausmutanten besitzen Punktmutationen im  $\beta_7$ -Integrin Gen, die zu einer Verkürzung des Rezeptors führen ( $\Delta 61$  und  $\Delta 34$ ) oder einen Aminosäureaustausch (D-R) in der zytoplasmatischen Domäne des Integrins hervorrufen sollen. Für diese Linien wurden Rückkreuzungszuchten mit C57BL/6-Tieren angesetzt, um nach zehn Generationen für zukünftige Experimente Tiere mit reinem C57BL/6-Hintergrund verwenden zu können.

#### **2.2.1 Analyse der Expression von $\beta_7$ -Integrin auf Lymphozyten der Mausmutanten**

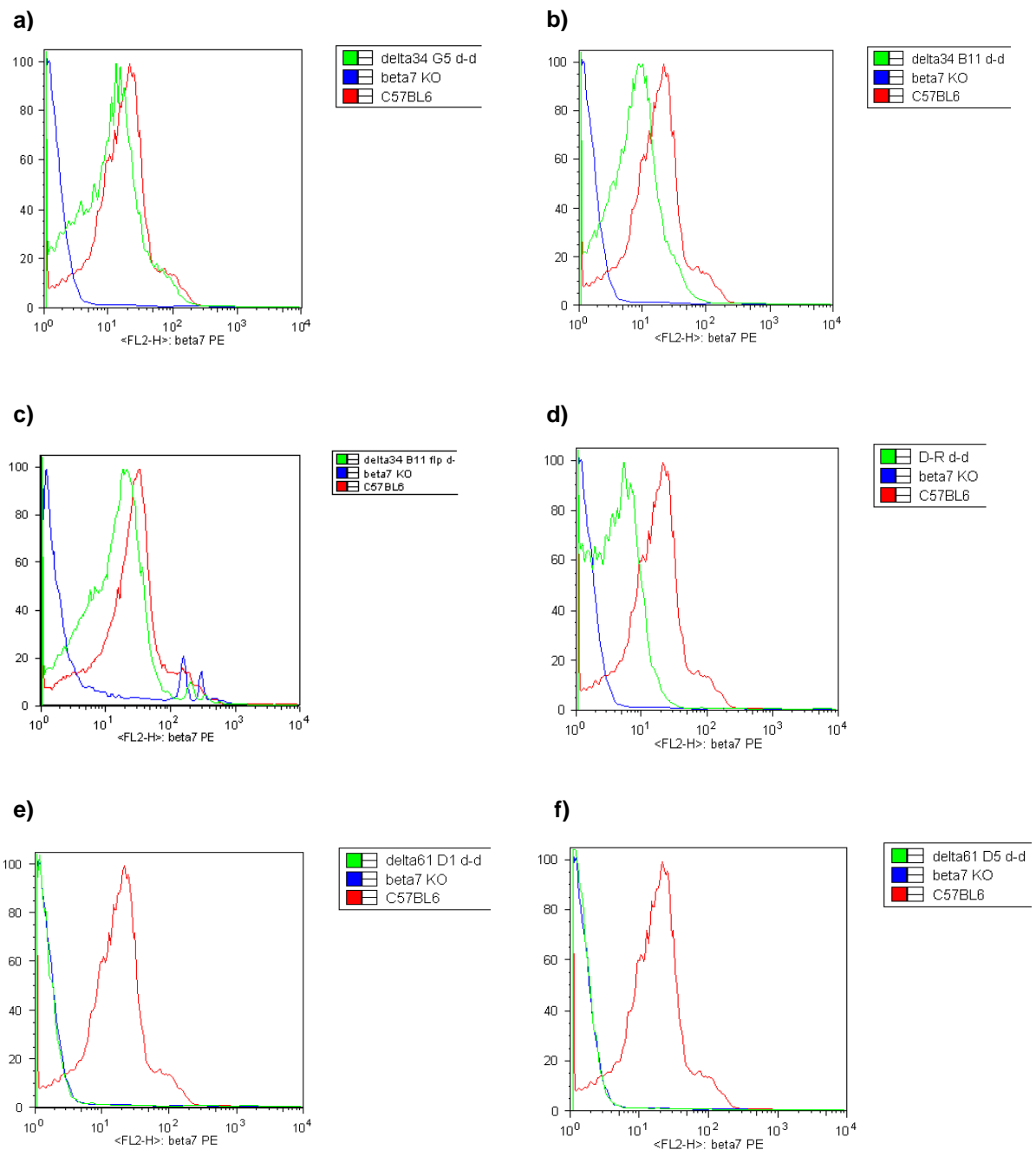
Die vier in das  $\beta_7$ -Integrin einzuführenden Mutationen sollen lediglich Veränderungen in der zytoplasmatischen Domäne hervorrufen. Da es sich bei Integrinen aber um transmembrane Heterodimere mit einer großen extrazellulären Domäne handelt, sollte als erstes untersucht werden, ob die eingeführten Mutationen Auswirkungen auf die Expression der extrazellulären Domäne des  $\beta_7$ -Integrins haben. Für diesen Zweck wurden Lymphozyten aus Milz, Blut, MLNs und PPs isoliert (siehe Material und Methoden Punkte 5.7.3 – 5.7.4 und 5.7.7) und mit einem fluoreszenzmarkierten anti- $\beta_7$ -Integrin Antikörper gefärbt. Als Vergleich wurden die Zellen zusätzlich mit einem anti- $\beta_1$ -Integrin Antikörper gefärbt, da dieses Integrin auch auf Lymphozyten exprimiert wird. In durchflusszytometrischen Analysen wurde dann die Expression von  $\beta_7$ - und  $\beta_1$ -Integrin auf der Oberfläche von Lymphozyten der Mausmutanten analysiert. Als Kontrollen in allen FACS-Analysen wurden entsprechende Zellen aus heterozygoten Geschwistertieren, C57BL/6-Wildtypieren und  $\beta_7$ -Integrin Knockout Tieren eingesetzt. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden alle Versuche mindestens drei mal wiederholt. Abb. 2.9 zeigt ein repräsentatives Ergebnis von anti- $\beta_7$ - und anti- $\beta_1$ -Integrin Färbungen an Milzzellen der einzelnen Mausmutanten.





Man sieht deutlich, dass sowohl C57BL/6- als auch die heterozygoten Geschwistertiere ( $\Delta/\text{wt}$ ) aller Linien eine normale  $\beta_7$ -Integrin Expression auf der Lymphozytenoberfläche zeigen. Bei  $\beta_7$ -Integrin Knockout Mäusen dagegen ist keine Expression des Rezeptors auf der Oberfläche der Zellen zu finden. Für die einzelnen homozygoten Mausmutanten ( $\Delta/\Delta$ ) lassen sich unterschiedliche  $\beta_7$ -Integrin Expressionen auf der Oberfläche der analysierten Lymphozyten beobachten. Keinen Unterschied in der  $\beta_7$ -Integrin Expression in Vergleich zu den Kontrolltieren (C57BL/6 und  $\Delta/\text{wt}$ ) zeigen homozygote Mutanten der  $\Delta 34$  G5 flp-Linie. Im Gegensatz dazu zeigen homozygote Tiere der beiden  $\Delta 34$  B11-Linien ( $\Delta 34$  B11 und  $\Delta 34$  B11 flp) eine leichte Reduktion in der  $\beta_7$ -Integrin Expression. In beiden Linien ist verglichen zu den Kontrollen ein Verlust der besonders stark exprimierenden  $\beta_7$ -Integrin-Population (*bright*-Population) zu beobachten (siehe Kreis).

Eine wesentlich deutlichere Reduktion der  $\beta_7$ -Integrin Expression stellt sich für homozygote D-R Mutanten dar, sowohl im Vergleich zu den Kontrollen als auch zu homozygoten Tieren der  $\Delta 34$  B11-Linien. Ein kompletter Verlust der  $\beta_7$ -Integrin Expression zeigt sich für homozygote Tiere der beiden  $\Delta 61$ -Linien. Genau wie bei  $\beta_7$ -Integrin defizienten Tiere kann hier keine Expression des Rezeptors auf der Oberfläche der Lymphozyten nachgewiesen werden. Um die Expressionsunterschiede besser verdeutlichen zu können, wurden Histogramme angefertigt, in denen die  $\beta_7$ -Integrin Expression der einzelnen Mausmutanten im direkten Vergleich mit der Expression der Kontrolltiere dargestellt ist (siehe Abb. 2.10).



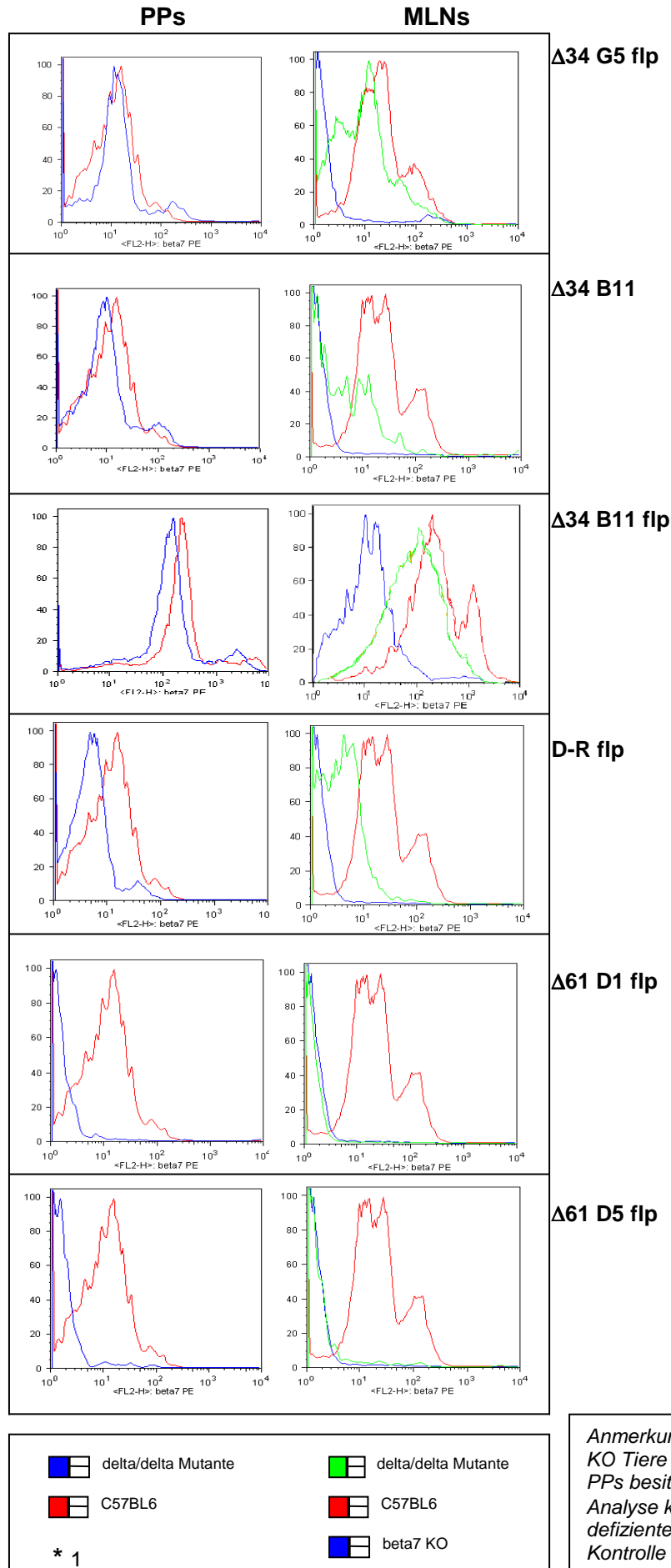
**Abb. 2.10: Vergleichende Histogramme zur Darstellung der unterschiedlichen  $\beta_7$ -Integrin Expressionen auf Lymphozyten der einzelnen Mausmutanten.**

Gezeigt sind Histogramm-Overlays, in denen jede Mausmutante mit den Kontrollen (C57BL/6 und  $\beta_7$ -Integrin KO) verglichen wird.  $\beta$ 7 KO -  $\beta_7$ -Integrin Knockout, d-d – für delta/delta – homozygot; Anmerkung zu Histogramm c): der Peak der  $\beta_7$ -Integrin-Expression bei der  $\beta_7$ -Integrin KO Mutante in diesem Graphen resultiert wahrscheinlich aus toten Zellen

Mausmutanten der Linie  $\Delta 34$  G5 zeigen in ihrer  $\beta_7$ -Integrin Expression keinen Unterschied zum Wildtyp (Abb. 2.10 [a]), während homozygote Tiere der beiden  $\Delta 34$  B11-Linien eine leichte Reduktion aufweisen (Abb. 2.10 [b], [c]). Die  $\beta_7$ -Integrin Expression von homozygoten D-R Mutanten liegt etwa in der Mitte der Expression von C57BL/6- und  $\beta_7$ -Integrin Knockout Tieren (Abb. 2.10 [d]); der anhand der FACS-Analysen beobachtete Phänotyp wird durch dieses Histogramm bestätigt.

Die vergleichenden Histogramme für homozygote Tiere der beiden  $\Delta 61$ -Linien (Abb. 2.10 [e], [f]) untermauern ebenfalls den schon beobachteten Phänotyp, nämlich den kompletten Verlust der  $\beta_7$ -Integrin Expression auf der Lymphozytenoberfläche.

Da die Expression von  $\beta_7$ -Integrin auf Lymphozyten beschränkt ist, die in das lymphatische Gewebe des Darms (GALT) rezirkulieren, wurden zusätzlich Lymphozyten aus PPs und MLNs der unterschiedlichen Mausmutanten isoliert und hinsichtlich ihrer  $\beta_7$ -Integrin Expression analysiert. Beide untersuchten Organe sind Bestandteile des GALT und stellen organisierte lymphatische Gewebe dar, welche verantwortlich sind für die Induktion von Immunantworten im Darm. Da  $\beta_7$ -Integrin hauptsächlich auf intestinalen Effektor- bzw. Gedächtnis-Lymphozyten exprimiert wird, findet man in diesen Organen eine hohe Dichte an  $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup>-Lymphozyten. Abb. 2.11 stellt die Ergebnisse dieser FACS-Analysen in vergleichenden Histogrammen grafisch dar.



**Abb. 2.11:**  
Vergleichende  
Analyse der  $\beta_7$ -  
Integrin  
Expression auf  
Lymphozyten der  
PPs und MLNs  
der einzelnen  
Mausmutanten.

Gezeigt sind  
Histogramm-  
Overlays, in  
denen jede  
einzelne  
Mausmutante mit  
den Kontrollen  
(C57BL/6 und  $\beta_7$ -  
Integrin KO)  
verglichen wird.

Anmerkung zu \*1: Da  $\beta_7$ -Integrin  
KO Tiere drastisch verkleinerte  
PPs besitzen, konnten für diese  
Analyse keine  $\beta_7$ -Integrin  
defizienten Lymphozyten als  
Kontrolle eingesetzt werden.

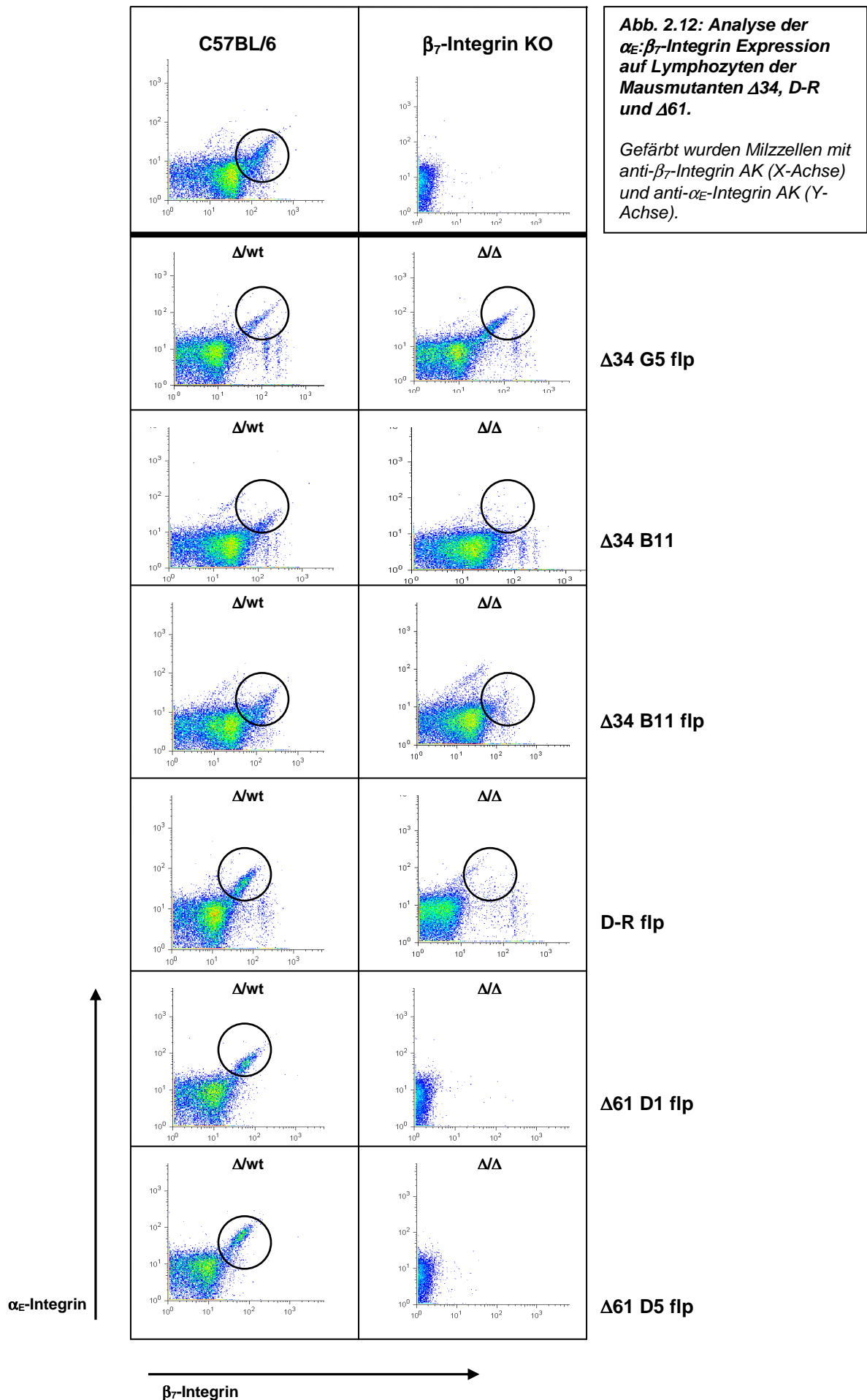
Wie aus den vergleichenden Histogrammen auf Abb. 2.11 hervorgeht, zeigen Lymphozyten der PPs und MLNs die gleichen Unterschiede in der  $\beta_7$ -Integrin Expression bei den einzelnen Mausmutanten wie die entsprechenden Milzzellen.

### **2.2.2 Analyse der $\alpha_E:\beta_7$ -Integrin Expression auf Lymphozyten der Mausmutanten**

$\beta_7$ -Integrine bilden ausschließlich mit  $\alpha_E$ - und  $\alpha_4$ -Integrinen Heterodimere. Daher sollte als nächstes die Frage beantwortet werden, ob die beobachteten Abweichungen in der  $\beta_7$ -Integrin Expression der unterschiedlichen Mausmutanten einen Einfluss haben auf die Interaktion mit den genannten  $\alpha$ -Integrinen. Für diesen Zweck wurden erneut FACS-Analysen durchgeführt, in denen Lymphozyten der Mausmutanten mit spezifischen AK gefärbt wurden. Im Rahmen dieser Dissertation konnte mittels FACS-Analyse nur die Expression des  $\alpha_E:\beta_7$ -Integrins analysiert werden, da bisher noch kein funktionell getesteter anti- $\alpha_4$ -Integrin AK zur Verfügung stand.

Abb. 2.12 zeigt für alle Mausmutanten die Analyse der  $\alpha_E:\beta_7$ -Integrin Expression mittels FACS-Analyse.

## 2 Ergebnisse





Die auf Abb. 2.12 dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beobachteten Unterschiede in der  $\beta_7$ -Integrin Expression der einzelnen Mausmutanten einen Einfluss haben auf die Interaktion des  $\beta_7$ -Integrins mit  $\alpha_E$ -Integrin. Es konnte gezeigt werden, dass sich Mausmutanten der Linie  $\Delta 34$  G5 hinsichtlich ihrer  $\alpha_E$ : $\beta_7$ -Integrin Expression nicht von C57BL/6 oder heterozygoten Geschwistertieren unterscheiden.

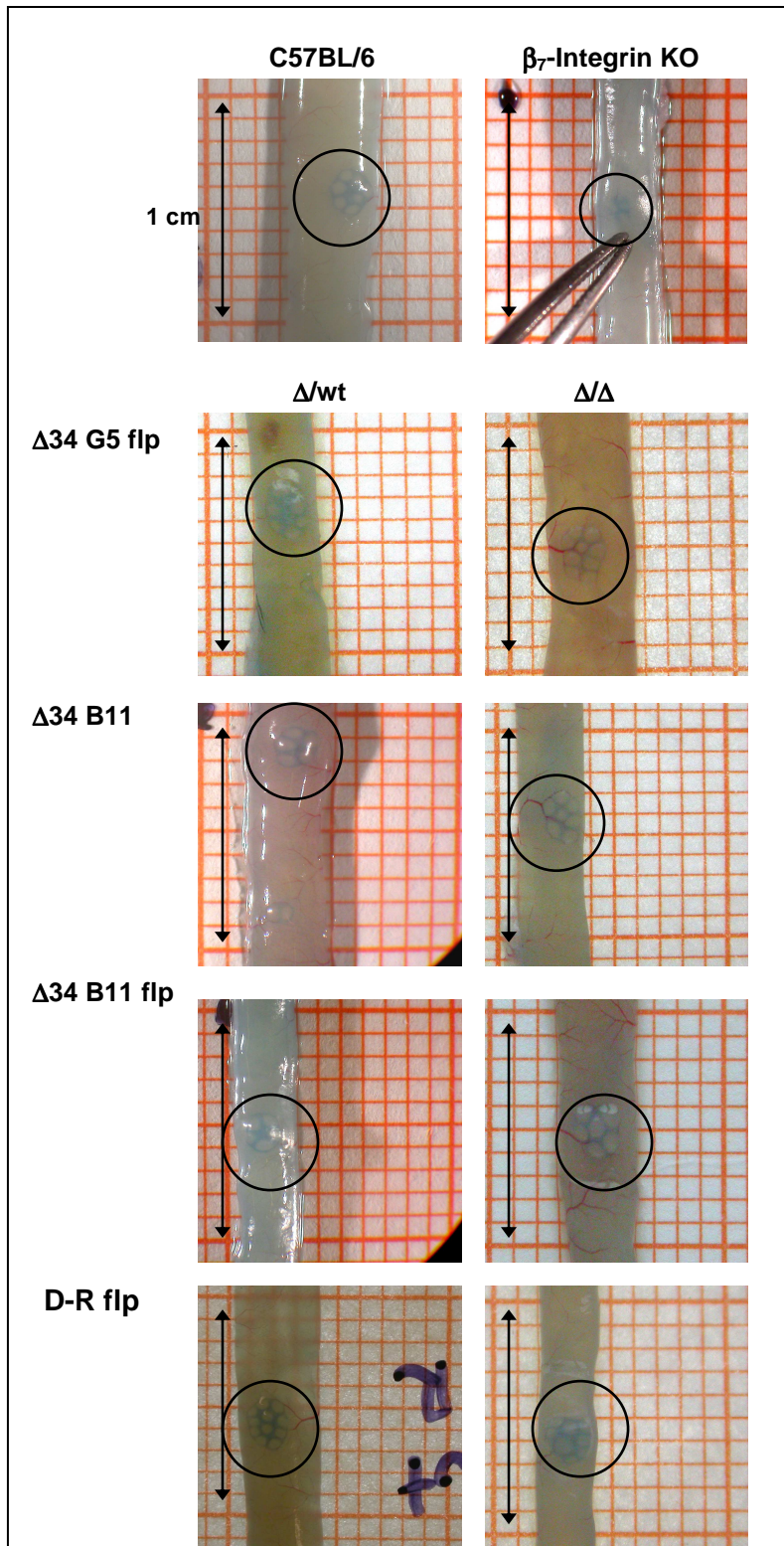
Dagegen lässt sich für homozygote Mausmutanten der Linien  $\Delta 34$  B11,  $\Delta 34$  B11 flp sowie D-R flp der Verlust einer kleinen  $\alpha_E$ : $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup>-Lymphozytenpopulation beobachten (siehe Kreis), die bei homozygoten D-R Mutanten stärker ausgeprägt ist. Lymphozyten der homozygoten  $\Delta 61$ -Linien exprimieren, wie  $\beta_7$ -Integrin Knockout Tiere, kein  $\alpha_E$ : $\beta_7$ -Integrin auf ihrer Oberfläche.

### 2.2.3 Histologische Analyse der Peyer'schen Platten von $\Delta 34$ und D-R Mutanten

Bei den PPs handelt es sich um organisierte, sekundäre lymphatische Organe, die, ähnlich wie Lymphknoten, ein Keimzentrum mit flankierenden T- und B-Zell-Bereichen besitzen. Genau wie MLNs gehören die PPs zu den induktiven Kompartimenten des GALT, da sie als lymphatische Organe an der Auslösung einer Immunantwort im Darm beteiligt sind. Man findet PPs auf der antimesenterialen Seite des Darms, wobei die Häufigkeit distal zunimmt, so dass sich die meisten und größten PPs im Bereich des terminalen Ileums befinden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, besitzen  $\beta_7$ -Integrin defiziente Mäuse stark verkleinerte PPs (im Vergleich zum WT auf 10 – 20 % reduziert), die zudem eine verminderte Zellularität und rudimentäre Follikel aufweisen. Die Anzahl der PPs von  $\beta_7$ -Integrin Knockout Mäusen ist jedoch vergleichbar mit ihrer Anzahl in WT-Mäusen (~ 8-12 im gesamten Dünndarm) und die Reduktion in der Größe der PPs manifestiert sich erst ab Tag drei nach der Geburt [35] [139]. Aufgrund dieses Phänotyps der  $\beta_7$ -Integrin defizienten Maus sollte als nächstes anhand der in dieser Arbeit generierten Mausmutanten untersucht werden, ob es durch die in die zytoplasmatische Domäne eingebrachten Mutationen ebenfalls zu Defekten im Aufbau der PPs kommt, d.h. ob die zytoplasmatische Domäne des  $\beta_7$ -Integrins einen Einfluss hat auf die Größe und den Aufbau der PPs. Für die Visualisierung der PPs wurde den Mausmutanten sowie Kontrolltieren (heterozygote Geschwistertiere, C57BL/6 und  $\beta_7$ -Integrin KO) intraperitoneal der Farbstoff Chicago Sky Blue injiziert (genaue Durchführung ist Material und Methoden Punkt 5.10.5 zu entnehmen). Durch die Anreicherung dieses Farbstoffes in lymphatischen Geweben werden alle im Dünndarm befindlichen PPs sichtbar blau angefärbt und können hinsichtlich ihres Aufbaus und ihrer Größe analysiert werden. Im Rahmen dieser Dissertation konnten die PPs der Mausmutanten  $\Delta 34$  G5,  $\Delta 34$  B11,  $\Delta 34$  B11 flp und D-R

flp sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert werden. Für  $\Delta 61$  Mausmutanten wurde bis jetzt nur eine qualitative Analyse der PPs durchgeführt.

Die histologische Analyse und Größenbestimmung der PPs erfolgte mit Hilfe eines konventionellen Binokulars und/oder einer flachen Durchlichtapparatur sowie einer Canon Digitalkamera.



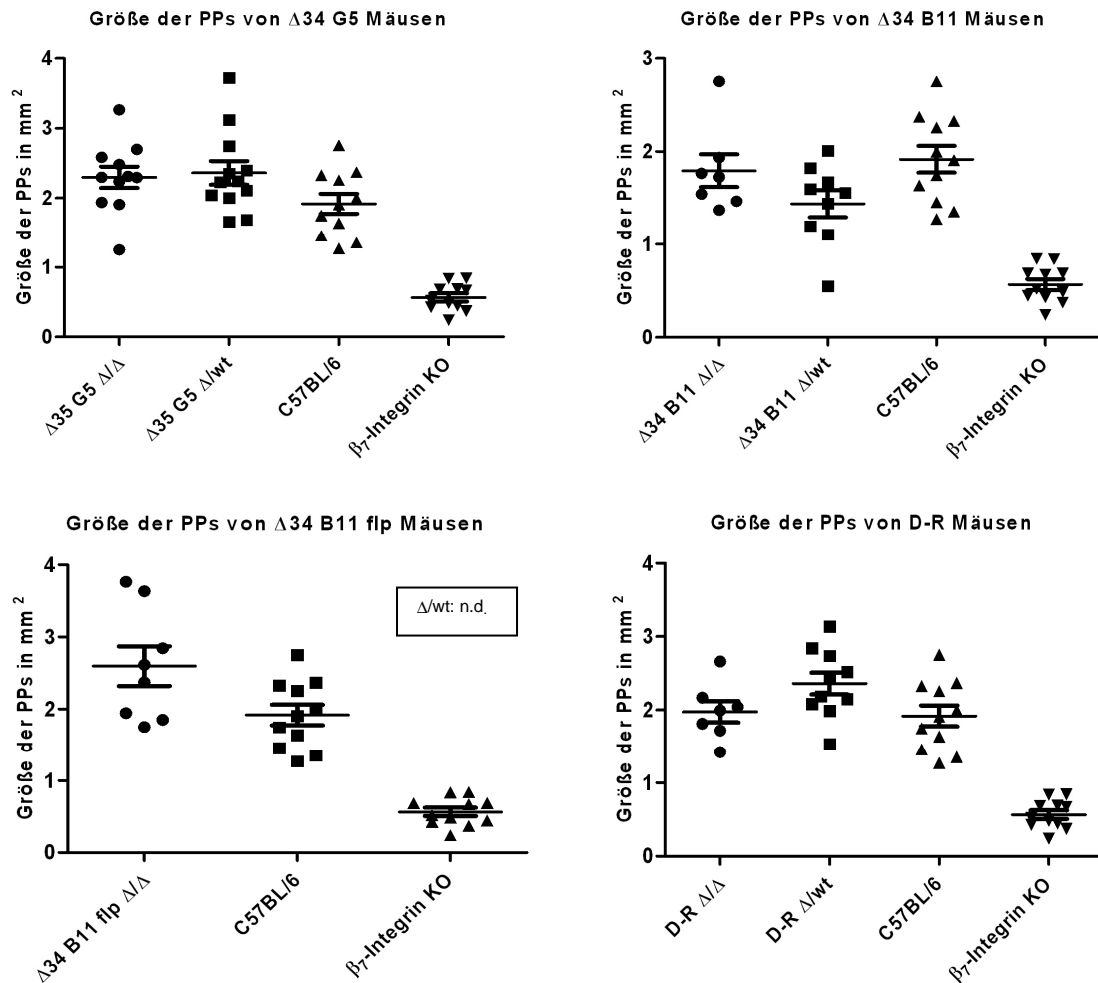
**Abb. 2.13: Repräsentative Aufnahmen von Dünndärmen mit PPs.**

Für die Visualisierung der PPs wurde den Mäusen der Farbstoff Chicago Sky Blue injiziert. Gezeigt sind Aufnahmen von den einzelnen homozygoten ( $\Delta/\Delta$ ) Mausmutanten und den jeweiligen heterozygoten Geschwistertieren ( $\Delta/\text{wt}$ ) sowie als Vergleich C57BL/6 und  $\beta_7$ -Integrin Knockout (KO). Der Pfeil kennzeichnet eine Länge von 1 cm. (Vergrößerung 5x)

Abb. 2.13 zeigt repräsentative Aufnahmen von Dünndärmen der einzelnen Mausmutanten sowie der Kontrolltiere, denen für die Visualisierung der PPs der Farbstoff Chicago Sky Blue injiziert wurde. Es ist zu sehen, dass die PPs der homozygoten Mausmutanten  $\Delta 34$  G5,  $\Delta 34$  B11 und D-R morphologisch vergleichbar sind mit den PPs von heterozygoten Kontrollen sowie den PPs von C57BL/6-Mäusen. Jeder einzelne PP ist klar konturiert und weist mehrere erkennbare Follikel auf. Im Gegensatz dazu sind PPs von  $\beta_7$ -Integrin defizienten Mäusen deutlich verkleinert, weisen meist nur 2-4 Follikel auf und sind nicht deutlich konturiert (siehe Abb. 2.13 oben rechts). Eine erste Analyse der PPs von  $\Delta 61$  Mausmutanten zeigte, dass die Anzahl der gefundenen PPs im Schnitt bei 1,4 im gesamten Dünndarm liegt, wohingegen für heterozygote Kontrolltiere eine mittlere Anzahl von 6 PPs im gesamten Dünndarm gefunden werden konnte. Jedoch konnten bis jetzt keine offensichtlichen Größenunterschiede in den PPs der  $\Delta 61$  Mutanten identifiziert werden.

### 2.2.4 Größenbestimmung der Peyer'schen Platten von $\Delta 34$ und D-R Mutanten

Um eventuelle Größenunterschiede der PP's von den einzelnen Mausmutanten festzustellen, wurden die PP's unter Zuhilfenahme eines Längenstandards ausgemessen, um mit Hilfe des Programms ImageJ die Fläche jedes einzelnen PP's bestimmen zu können. Abb. 2.14 zeigt die Ergebnisse dieser Größenbestimmung.



**Abb. 2.14:** Größenbestimmung der PP's von den Mausmutanten  $\Delta 34$  G5,  $\Delta 34$  B11,  $\Delta 34$  B11 flp sowie D-R.

Alle PP's jeweils eines Darms wurden ausgemessen; als Kontrollen dienten heterozygote Geschwistertiere ( $\Delta/wt$ ), sowie C57BL/6- und  $\beta_7$ -Integrin defiziente Tiere; Flächenangabe in  $\text{mm}^2$

Keine der Mausmutanten zeigt signifikante Abweichungen in der Größe der PP's im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Durchschnittsfläche eines PP's beträgt für alle Mausmutanten sowie für die WT-Kontrollen  $2 \pm 0,5 \text{ mm}^2$ . Erwartungsgemäß sind die PP's der  $\beta_7$ -Integrin defizienten-Tiere drastisch verkleinert ( $0,6 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ ).

### 2.3 Analyse der MAdCAM-1 defizienten Mausmutante

Wie schon zu Beginn dieses Kapitels erwähnt wurde, ist ein weiteres Ziel dieser Dissertation die Analyse der MAdCAM-1 defizienten Mausmutante. MAdCAM-1 ist der endotheliale Rezeptor für  $\beta_7$ -Integrin und L-Selektin und wird konstitutiv in Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben exprimiert (postkapillare Venolen der Lamina Propria, MLNs, HEVs der PPs sowie der Milz) [32] [82] [83]. Da das  $\beta_7$ -Integrin als *homing*-Rezeptor einer der Hauptakteure für die Migration von Lymphozyten in das GALT ist, sollte anhand der MAdCAM-1 defizienten Mausmutante nun die *in vivo* Funktion von MAdCAM-1 für die Migration der Lymphozyten analysiert werden. Zur Analyse des Migrationsverhaltens von Lymphozyten in MAdCAM-1 defizienten Mäusen sollen *in vivo* Migrationsassays durchgeführt werden, um den Einfluss von MAdCAM-1 für das *homing* der Lymphozyten bewerten zu können. Außerdem sollen anhand histologischer Techniken die lymphatischen Gewebe von MAdCAM-1 defizienten Mausmutanten analysiert werden, um eventuelle Defekte, hervorgerufen durch den Verlust von MAdCAM-1, identifizieren und analysieren zu können. Des Weiteren soll mit Hilfe von Immunisierungsexperimenten die Rolle von MAdCAM-1 bei humoralen Immunantworten untersucht werden.

#### 2.3.1 *Gene targeting* von MAdCAM-1

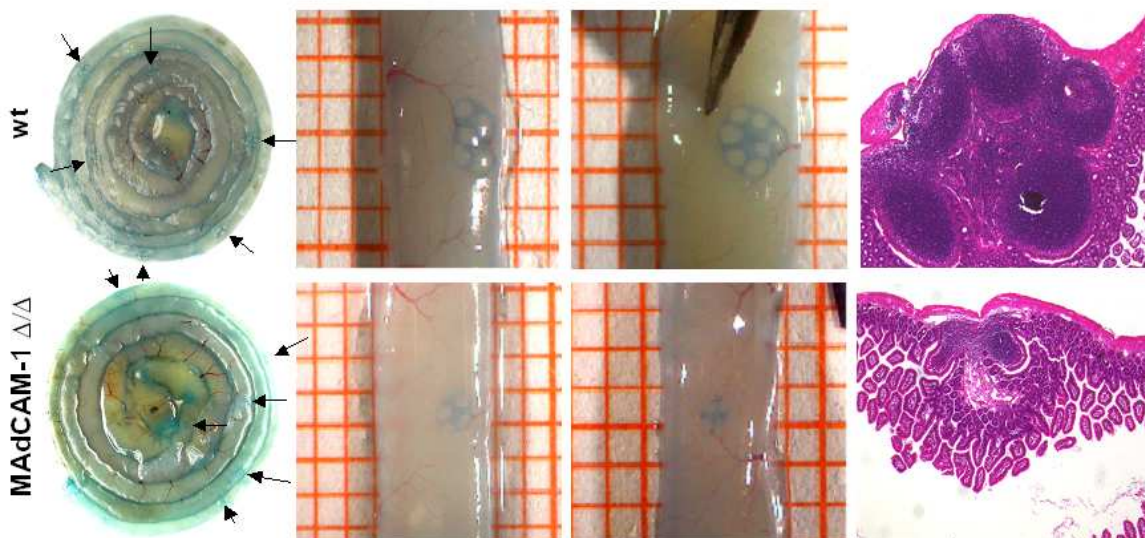
Vor Beginn dieser Arbeit wurde in unserem Labor durch gezieltes *gene targeting* eine MAdCAM-1 defiziente Mausmutante hergestellt. Diese Mäuse sind lebensfähig, weisen keine gravierenden Defekte auf und wurden für eine detailliertere Phänotyp-Analyse auf dem C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt. Für die Verifizierung der Deletion von MAdCAM-1 wurden Expressionsanalysen sowohl auf DNA-, RNA- und Proteinebene durchgeführt. Mit Hilfe von Southern- und Northern Blot Analysen sowie RT-PCR wurde die Deletion auf DNA- und RNA-Ebene überprüft und verifiziert. Durch den Einsatz von AK gegen MAdCAM-1 in immunhistochemischen Färbungen konnte die Deletion des Adhäsionsmoleküls schließlich auch auf Proteinebene bewiesen werden (unveröffentlichte Daten von Angela Schippers).



### 2.3.2 Histologische Analyse der Peyer'schen Platten von adulten MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ Mutanten

Da MAdCAM-1 u.a. auf den HEVs der PPs exprimiert wird, sollte als erstes mit Hilfe histologischer Techniken untersucht werden, ob der Verlust von MAdCAM-1 Auswirkungen auf den Aufbau und die Größe der PPs hat. Für diesen Zweck wurde, wie unter Material und Methoden Punkt 5.10.5 beschrieben, den Mäusen zur Visualisierung lymphatischer Gewebe der Farbstoff Chicago Sky Blue injiziert.

Durch die Anreicherung des Farbstoffes in lymphatischen Geweben wurde die Identifikation und Beurteilung der PPs sowohl in MAdCAM-1 defizienten Tieren als auch in WT-Tieren erleichtert. Für eine genauere morphologische Analyse der PPs wurden des Weiteren HE-Färbungen an Parafinschnitten durchgeführt. Abb. 2.15 zeigt repräsentative Aufnahmen sowohl der durch Chicago Sky Blue angefärbten PPs als auch HE-Färbungen. Wie man sehen kann, sind die PPs der MAdCAM-1 defizienten Mausmutante im Vergleich zu den PPs der Kontrolltiere (WT – C57BL/6) drastisch verkleinert. Zudem weisen die PPs der MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutanten im Vergleich zu C57BL/6-Tieren weniger und schwach konturierte Follikel auf. Diese Beobachtung wird durch die an Parafinschnitten vorgenommenen HE-Färbungen untermauert. PPs von MAdCAM-1 defizienten Mausmutanten weisen nicht den für WT-Tiere typischen PP-Aufbau auf. Es sind keine einzelnen Keimzentren mit flankierenden T- und B-Zell Bereichen erkennbar. Genau wie bei  $\beta_7$ -Integrin defizienten Tieren, weisen die PPs von MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutanten eine verminderte Zellularität und rudimentäre Follikel auf.

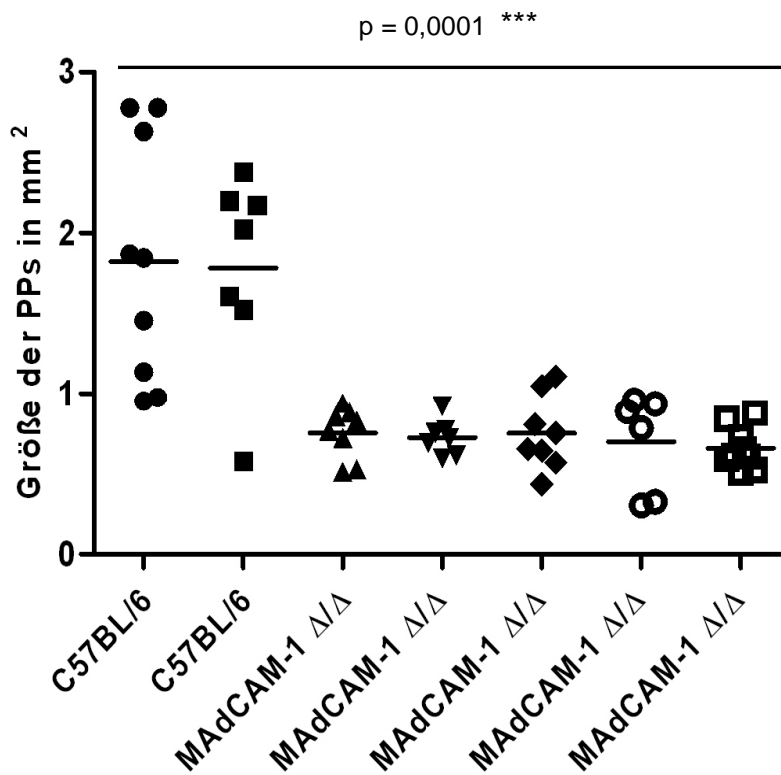


**Abb. 2.15: Repräsentative Aufnahmen von Dünndärmen mit PPs sowie HE-Färbungen von PPs an Parafinschnitten.**

Zu sehen sind Dünndärme von Mäusen, die für die Visualisierung der PPs mit dem Farbstoff Chicago Sky Blue injiziert wurden. Rechts in der Abb. sind HE (Hämatoxylin-Eosin)-Färbungen von PPs an Parafinschnitten dargestellt. Die Pfeile in den aufgerollten Dünndärmen deuten auf die PPs.  
WT – C57BL/6, MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  – MAdCAM-1 defiziente Mausmutante

### 2.3.3 Größenbestimmung der Peyer'schen Platten von MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ Mutanten

Wie schon auf Abb. 2.15 gezeigt werden konnte, äußert sich der Phänotyp der MAdCAM-1 defizienten Mausmutante u.a. in einer drastischen Verkleinerung der PPs. Um diese Unterschiede zu quantifizieren, erfolgte die Größenbestimmung der PPs mehrerer Dünndärme von C57BL/6-Wildtypmäusen und MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutanten. Anhand der ermittelten Größe jedes PP konnte dann eine Flächenbestimmung in  $\text{mm}^2$  erfolgen. Abb. 2.16 stellt die Größenbestimmung der PPs von MAdCAM-1 defizienten Mutanten und Kontrolltieren grafisch dar.



**Abb. 2.16: Größenbestimmung der PPs von MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$ - und C57BL/6-Tieren.**

Von je zwei C57BL/6 und fünf MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Därmen wurden die PPs gemessen, um deren Fläche bestimmen zu können. Die Y-Achse repräsentiert die Fläche der PPs in  $\text{mm}^2$ . Signifikanz der Daten wird durch eingefügte \* repräsentiert.

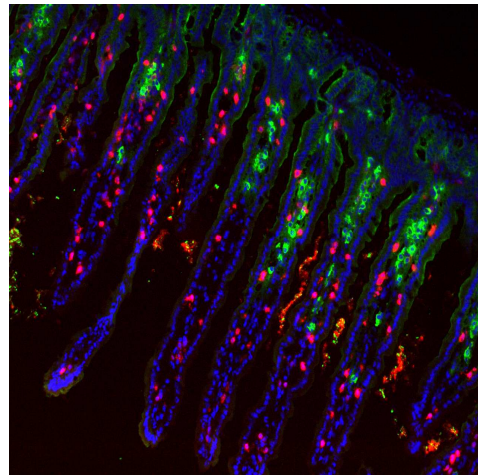


Es wird deutlich, dass bezüglich der Größe der PPs signifikante Unterschiede zwischen MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  und C57BL/6-Tieren bestehen. Die mittlere Größe der PPs von C57BL/6-Kontrolltieren beträgt  $1,8 \text{ mm}^2$ ; die PPs der MAdCAM-1 defizienten Tiere dagegen weisen eine mittlere Größe von  $0,7 \text{ mm}^2$  auf. Durch den Verlust von MAdCAM-1 kommt es also zu einer Reduktion in der Größe der PPs um ca. 60 %.

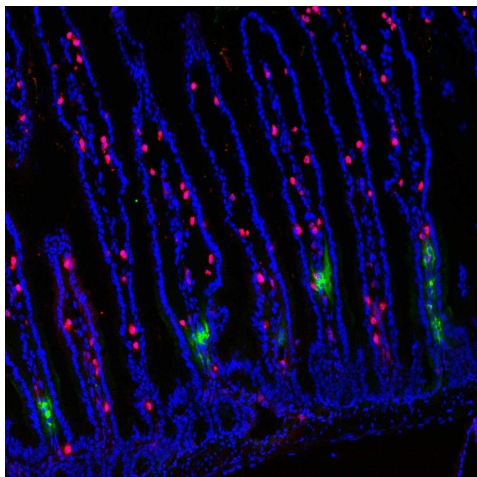
Die gemessenen Werte für C57BL/6-Kontrolltiere weisen eine starke Streuung auf. Diese Streuung liegt höchstwahrscheinlich der Tatsache zugrunde, dass, wie schon in Abschnitt 2.2.4 beschrieben wurde, die Größe der PPs distal zum terminalen Ileum hin zunimmt. Im Dünndarm einer WT-Maus findet man daher eine unterschiedliche Anzahl von PPs, die in ihrer Größe von  $1 - 3 \text{ mm}^2$  variieren können. Dagegen sind die ermittelten Werte der MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutanten keiner starken Streuung unterworfen; für keinen der gemessenen PPs wurde eine Fläche größer als  $1 \text{ mm}^2$  festgestellt.

### 2.3.4 Quantifizierung von IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria von MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ Mutanten

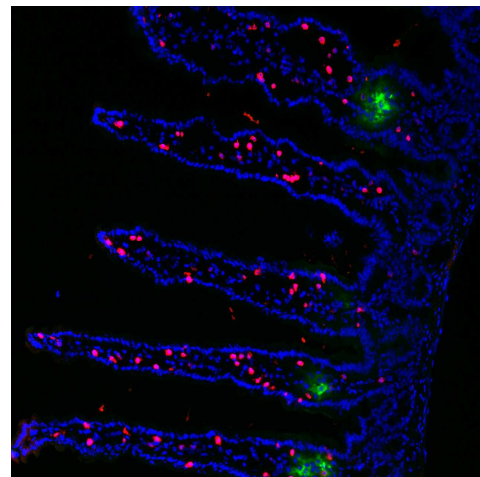
IgA-Plasmazellen migrieren vorzugsweise in die Lamina Propria des Darms um dort sekretorisches IgA abzugeben. So wie für T-Effektorzellen ist das Integrin  $\alpha_4\beta_7$  auch für das *homing* von IgA-Plasmazellen von entscheidender Bedeutung. Dies konnte zum einen durch die Analyse der  $\beta_7$ -Integrin defizienten Maus gezeigt werden, bei der eine drastische Reduktion in der Anzahl der IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria des Darms festgestellt werden konnte [35]. In Infektionsexperimenten mit Rotaviren wurde gezeigt, dass eine große Fraktion von IgA-Plasmazellen, die durch die Infektion mit dem Virus in den intestinalen lymphatischen Geweben induziert wurden, große Mengen des Integrins  $\alpha_4\beta_7$  exprimieren [148]. Auch humane IgA-Plasmazellen in der intestinalen Lamina Propria exprimieren dieses Integrin [70]. Diese Tatsachen lassen die Vermutung zu, dass MAdCAM-1 als endothelialer Rezeptor für das  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin ebenso von entscheidender Bedeutung für die Ansammlung von IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria des Darms ist. Um dies zu untersuchen, wurden zum einen histologische Techniken angewandt, mit deren Hilfe die Verteilung der IgA-Plasmazellen im Darm von MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mäusen analysiert werden sollte. Abb. 2.17 zeigt repräsentative Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen der Lamina Propria von MAdCAM-1 defizienten und  $\beta_7$ -Integrin defizienten Tieren sowie von C57BL/6 WT-Tieren.



C57BL/6



MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$



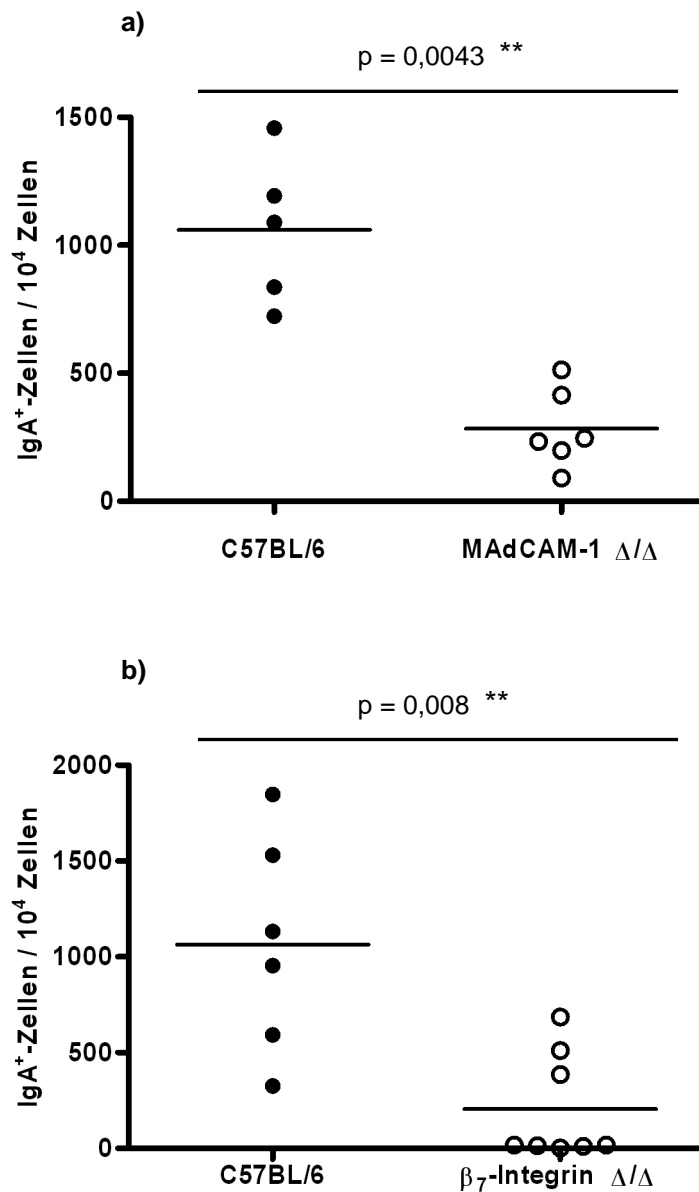
$\beta_7$ -Integrin  $\Delta/\Delta$

**Abb. 2.17: Immunfluoreszenzfärbungen des Darms von C57BL/6 (WT), MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  und  $\beta_7$ -Integrin  $\Delta/\Delta$  Tieren zur Analyse der Verteilung von IgA-Plasmazellen.**

Gefärbt wurden Gefrierschnitte von Dünndärmen für IgA (grün), CD3 (rot) sowie für Nuklei (blau).

Im Gegensatz zu WT-Tieren (C57BL/6), die eine normale Anzahl IgA<sup>+</sup>-Zellen aufweisen, ist die Anzahl der IgA-Plasmazellen im Darm der MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutanten stark reduziert. Nur vereinzelte IgA<sup>+</sup>-Zellen sind hier zu finden. Diese Reduktion ist vergleichbar mit der ebenfalls identifizierten Abnahme der IgA-Plasmazellen im Dünndarm von  $\beta_7$ -Integrin defizienten Mutanten. Mit Hilfe dieser histologischen Untersuchung konnte ein erster Beweis dafür geliefert werden, dass das Fehlen von MAdCAM-1 die Ansammlung von IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria beeinflusst. Um diesen Phänotyp auch quantitativ bestätigen zu können, wurden als nächstes Elispot-Analysen durchgeführt. Für diesen Zweck wurden Lymphozyten der Lamina Propria aus MAdCAM-1 defizienten

Tieren sowie aus Kontrolltieren (C57BL/6) isoliert, um auf Einzelzellebene mittels der in Material und Methoden Punkt 5.8.3 beschriebenen Elispot-Technik eine Quantifizierung von IgA<sup>+</sup>-Zellen durchführen zu können. Abb. 2.18 zeigt eine grafische Darstellung der aus den Elispot-Analysen gewonnenen Ergebnissen.



**Abb. 2.18:**  
Quantifizierung von IgA<sup>+</sup>-Zellen mittels Elispot-Analysen.

Es wurden Lymphozyten der Lamina Propria isoliert und mit Hilfe der Elispot-Technik auf das Vorhandensein von IgA-Plasmazellen analysiert. Dargestellt sind zwei Analysen, in denen jeweils MAdCAM-1 (a) bzw.  $\beta_7$ -Integrin defiziente Tiere (b) mit WT-Tieren (C57BL/6) verglichen werden. Die Y-Achse repräsentiert die Anzahl IgA<sup>+</sup>-Zellen pro 10<sup>4</sup> isolierter Lymphozyten der Lamina Propria. Signifikanz der Daten wird durch eingefügte \* repräsentiert.

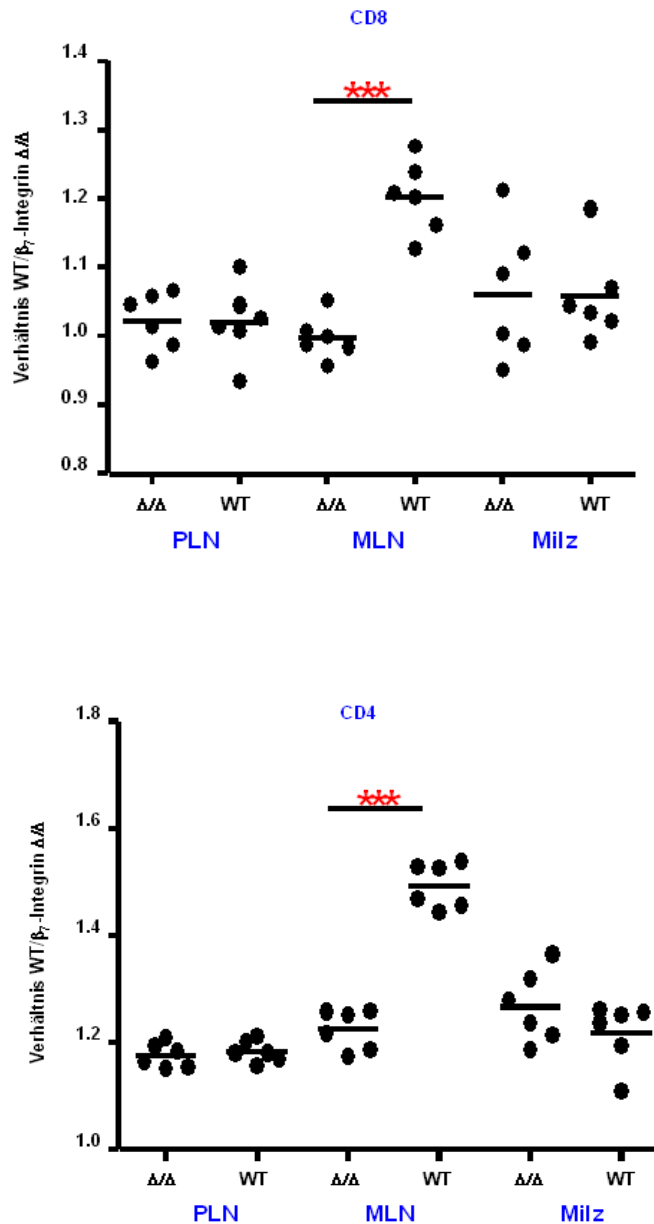
Durch die auf Abb. 2.18 dargestellten Elispot-Analysen konnte der in den histologischen Analysen identifizierte Phänotyp der MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutante quantitativ belegt werden. Der Verlust von MAdCAM-1 in der Maus hat eine starke Reduktion von IgA<sup>+</sup>-Zellen in der Lamina Propria zur Folge. Derselbe Effekt konnte auch für  $\beta_7$ -Integrin defiziente Tiere mit Hilfe der Elispot-Technik beobachtet werden, auch hier ist die Anzahl von IgA-Plasmazellen im Dünndarm stark reduziert. Statistisch gesehen konnten sowohl für MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  als auch für  $\beta_7$ -Integrin  $\Delta/\Delta$  Mutanten im Vergleich zu C57BL/6 WT-Tieren signifikante Unterschiede in der Anzahl IgA<sup>+</sup>-Zellen in der Lamina Propria des Darms identifiziert werden. Für C57BL/6 Tiere konnten im Schnitt 1100 IgA-Plasmazellen aus  $10^4$  isolierten Lymphozyten der Lamina Propria ermittelt werden. Sowohl für MAdCAM-1 als auch  $\beta_7$ -Integrin defiziente Tiere waren es lediglich durchschnittlich 200-250/ $10^4$  Lymphozyten. Im Vergleich zum WT ist die Anzahl IgA<sup>+</sup>-Lymphozyten von MAdCAM-1 bzw.  $\beta_7$ -Integrin  $\Delta/\Delta$  Mutanten daher auf ca. 20 % reduziert.

Sowohl die histologischen Untersuchungen, als auch die durchgeführten Elispots zur Analyse der Verteilung von IgA-Plasmazellen beweisen, dass die Interaktion von  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und MAdCAM-1 unerlässlich ist für das Vorhandensein von IgA-sezernierenden Plasmazellen in der Lamina Propria des Dünndarms.

### **2.3.5 Analyse des Migrationsverhaltens von T-Lymphozyten in MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ Mutanten**

Als nächstes sollte herausgefunden werden, ob die Migration von T-Zellen ebenso von MAdCAM-1 -  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin Wechselwirkungen abhängig ist.

Für diesen Zweck wurden *in vivo* `short-term` Migrationsassays durchgeführt, mit deren Hilfe das *homing* von CD4- bzw. CD8-T-Lymphozyten in verschiedene lymphatische Organe in MAdCAM-1 defizienten Mutanten untersucht werden sollte. Für die Beurteilung der Wechselwirkung von MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin wurden Lymphozyten von C57BL/6- und  $\beta_7$ -Integrin defizienten Mäusen isoliert, mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, zu gleichen Anteilen gemischt und sowohl WT (C57BL/6)- als auch MAdCAM-1 defizienten Mäusen in die Schwanzvene injiziert. Nach 18 h erfolgte die Präparation der Lymphozyten aus Milz, MLNs, sowie PLNs der Empfängertiere und die Verteilung der Kontroll- und  $\beta_7$ -Integrin defizienten Spender-Lymphozyten wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen ermittelt (genaue Durchführung siehe Material und Methoden Punkt 5.8.4). Durch die Bestimmung des relativen Verhältnisses von WT- und  $\beta_7$ -Integrin defizienten Lymphozyten konnte dann beurteilt werden, ob das *homing* der Lymphozyten von der Wechselwirkung der beiden Adhäsionsmoleküle abhängig ist. Abb. 2.19 zeigt die grafische Darstellung der *in vivo* `short-term` Migrationsassays.



**Abb. 2.19: In vivo short-term Migrationsassays.**

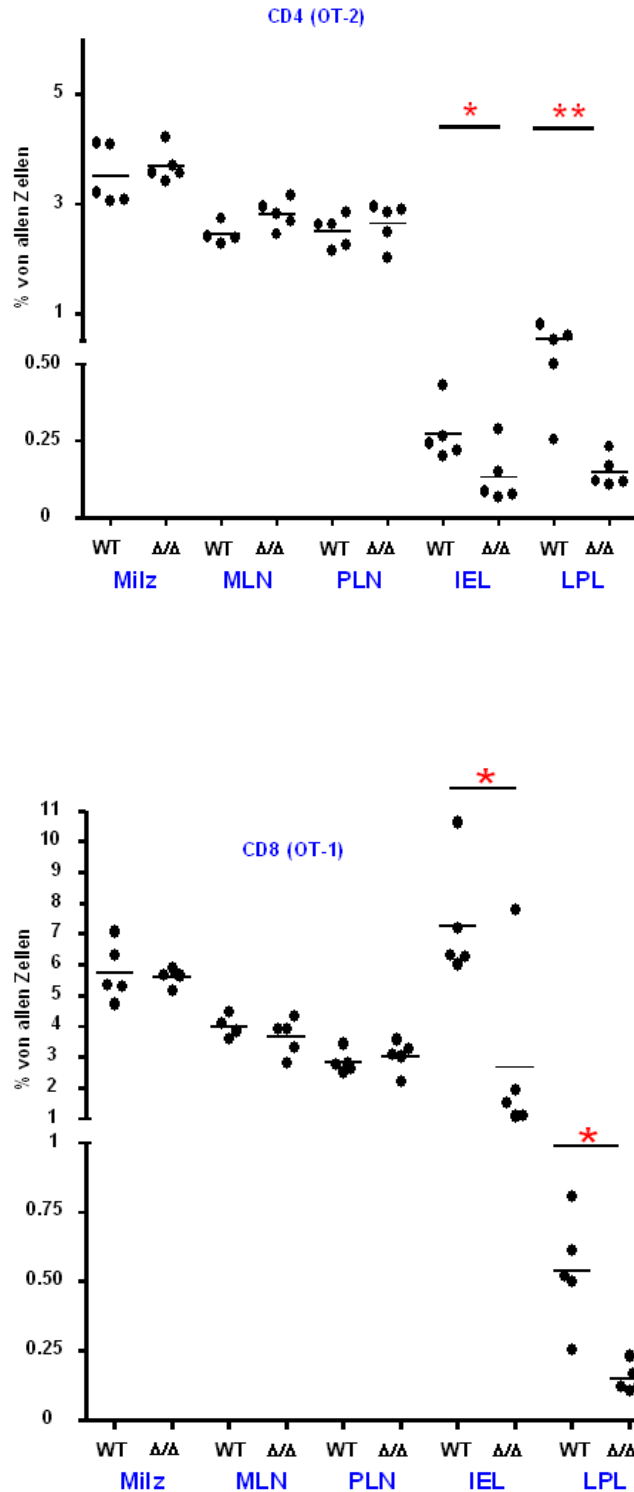
Die Migration von WT- bzw.  $\beta_7$ -Integrin defizienten Lymphozyten in PLN, MLN und Milz von C57BL/6 und MAdCAM-1 defizienten Tieren wurde untersucht.  $\Delta/\Delta$  - MAdCAM-1 defiziente Mausmutante, WT – C57BL/6, PLN – periphere Lymphknoten, MLN – mesenteriale Lymphknoten. Die Y-Achse repräsentiert das relative Verhältnis von WT- zu  $\beta_7$ -Integrin defizienten Lymphozyten. Signifikanz der Daten wird durch eingefügte \* repräsentiert.

Wie aus Abb. 2.19 hervorgeht, ist kein Unterschied im Migrationsverhalten der  $\beta_7$ -Integrin defizienten Lymphozyten im Vergleich zu WT-Lymphozyten in MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutanten zu erkennen. Jedoch ist, sowohl für CD4- als auch für CD8-T-Lymphozyten, in WT-Tieren eine beeinträchtigte Migration der  $\beta_7$ -Integrin defizienten Lymphozyten in die mesenterialen Lymphknoten (MLN) zu beobachten.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass für die Migration von T-Lymphozyten in MLN, aber nicht in PLN und Milz, die spezifische Interaktion von MAdCAM-1 und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin benötigt wird.

### 2.3.6 Analyse des Migrationsverhaltens von immunkompetenten T-Effektorzellen in MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ Mutanten

Durch die auf Abb. 2.19 dargestellten Ergebnisse der *in vivo* Migrationsassays konnte gezeigt werden, dass die Migration von T-Lymphozyten in MLN die Interaktion von MAdCAM-1 und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin benötigt. Als nächstes sollte nun untersucht werden, ob das *homing* von immunkompetenten T-Effektorzellen ebenfalls die Expression von MAdCAM-1 benötigt. Für diesen Zweck wurden adoptive Transferexperimente durchgeführt, in denen TCR (*T cell receptor*)-transgene T-Zellen in C57BL/6- und MAdCAM-1 defiziente Tiere transferiert wurden. Bei den TCR-transgenen T-Zellen handelt es sich um OT-1 (CD8-präsentiert) bzw. OT-2 (CD4-präsentiert) T-Zellen, die das im Kontext von MHC-Klasse I bzw. Klasse II präsentierte Peptid OVA (für OT-1 OVA<sub>257-264</sub>, für OT-2 OVA<sub>323-339</sub>) aus dem Hühnerei-Albumin erkennen. In der FACS-Analyse können dann mit AK gegen die variablen Teile des transgenen TCR OT-1 bzw. OT-2 T-Zellen identifiziert werden. Dieser Transfer von TCR-transgenen T-Zellen in syngene Mäuse erlaubt die Untersuchung von T-Zellantworten auf Immunisierungen mit dem entsprechenden Antigen [149] [150] [151]. Für die Untersuchung des Migrationsverhaltens von immunkompetenten T-Zellen wurden Lymphozyten aus OT-1 bzw. OT-2 transgenen Mäusen isoliert und in C57BL/6- bzw. MAdCAM-1 defiziente Rezipienten transferiert, denen einen Tag später i.p. OVA+LPS injiziert wurde. Drei Tage nach dieser Immunisierung erfolgte die Präparation von Lymphozyten aus Milz, MLN, PLN, IEL sowie LPL der Rezipiententiere (genaue Durchführung ist Material und Methoden Punkt 5.8.5 zu entnehmen). Mittels FACS-Analyse wurde dann die Anzahl der transferierten Zellen in den verschiedenen lymphatischen Organen ermittelt. Abb. 2.20 zeigt die grafische Darstellung des Ergebnisses der adoptiven Transfer Experimente.



**Abb. 2.20: Adoptiver Transfer von OT-1 bzw. OT-2 T-Lymphozyten in WT (C57BL/6) bzw. MAdCAM-1 defiziente Empfängertiere.**

Drei Tage nach Immunisierung mit OVA+LPS wurde die Anzahl der transferierten Zellen in Milz, MLN, PLN, IEL und LPL durchflusszytometrisch ermittelt.

Δ/Δ - MAdCAM-1 defiziente Mausmutante, WT – C57BL/6, MLN – mesenteriale Lymphknoten, PLN – periphere Lymphknoten, IEL – intraepitheliale Lymphozyten, LPL – Lamina Propria Lymphozyten.

Die Y-Achse repräsentiert den Prozentsatz von allen transferierten Zellen.

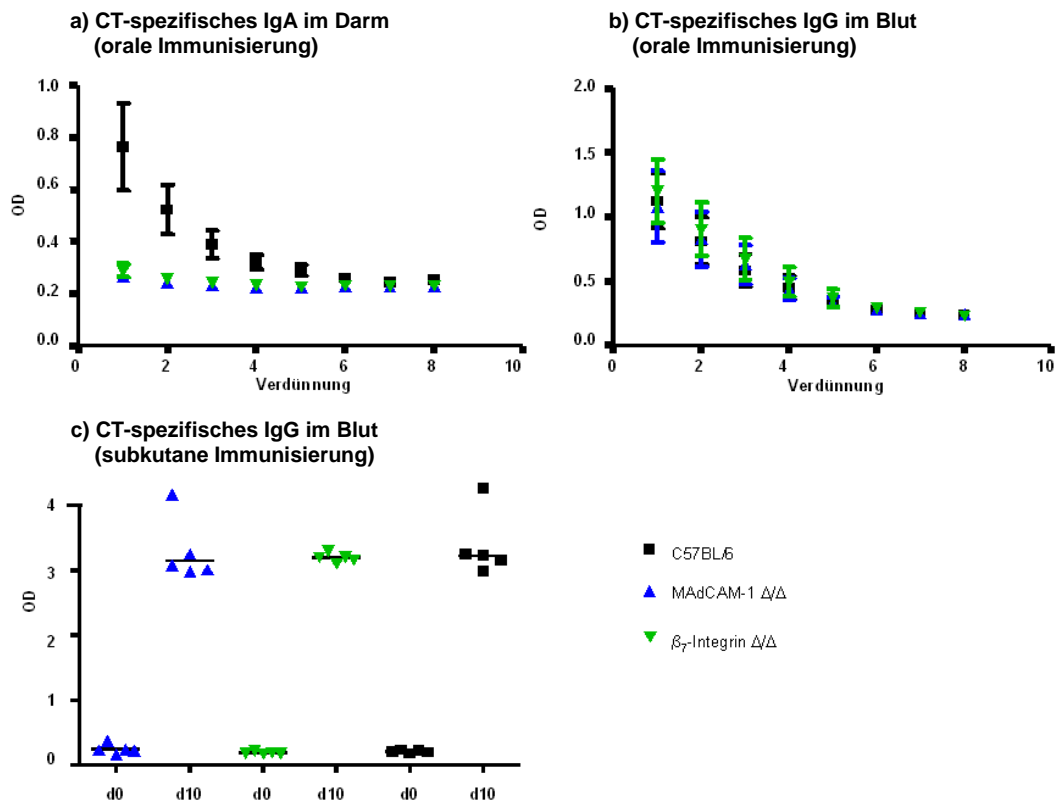
Signifikanz der Daten wird durch eingefügte \* repräsentiert.



Es wird deutlich, dass, obwohl das Fehlen von MAdCAM-1 keine Auswirkungen auf die Antigen-spezifische Aktivierung und Expansion von transgenen T-Lymphozyten in Milz, MLN und PLN hat, OT-1 bzw. OT-2 T-Zellen beeinträchtigt sind in ihrer Fähigkeit in das intraepitheliale Lamina Propria Kompartiment einzuwandern. Sowohl für OT-1 als auch für OT-2 T-Zellen ist im Vergleich zum WT eine signifikante Abnahme in der Anzahl der transferierten Zellen in die genannten Organe zu beobachten. Damit konnte gezeigt werden, dass auch für die Migration von Antigen-erfahrenen T-Lymphozyten in spezifische Bereiche des Darms (IEL und LPL) die Interaktion von MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin notwendig ist.

### **2.3.7 Analyse der humoralen Immunantwort in MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ und $\beta_7$ -Integrin $\Delta/\Delta$ Mutanten**

Anhand der in den Abb. 2.17 und 2.18 dargestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass für das Vorhandensein von IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria des Darms die Interaktion der Adhäsionsmoleküle MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin notwendig ist. Um herauszufinden, ob das Fehlen von MAdCAM-1 bzw.  $\beta_7$ -Integrin auch die humorale Immunantwort beeinflusst, wurden Immunisierungsexperimente mit Cholera-toxin durchgeführt, um anschließend mittels ELISA Antigen-spezifisches IgA bzw. IgG im Blut bzw. im Fäzes nachzuweisen. Für diesen Zweck wurden sowohl MAdCAM-1 bzw.  $\beta_7$ -Integrin defiziente Tiere sowie C57BL/6-Tiere oral und subkutan mit 10  $\mu$ g Cholera-toxin immunisiert. Für den Nachweis von IgA bzw. IgG mittels ELISA erfolgte die Aufarbeitung von Blut bzw. Fäzes wie unter Material und Methoden Punkt 5.7.5-5.7.6 beschrieben. Die genaue Durchführung des ELISA ist Material und Methoden Punkt 5.9 zu entnehmen. Abb. 2.21 zeigt repräsentative ELISA-Daten, die anhand dieser Experimente gewonnen werden konnten.



**Abb. 2.21: Nachweis Choleratoxin (CT)-spezifischer Immunglobuline nach oraler/subkutaner Immunisierung von C57BL/6, MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  und  $\beta_7$ -Integrin  $\Delta/\Delta$  Tieren.**

Dargestellt sind repräsentative ELISA-Daten zum Nachweis von CT-spezifischem IgA / IgG im Blut bzw. im Fäzes der immunisierten Tiere. In a) ist der Nachweis von CT-spezifischem IgA im Fäzes nach oraler Immunisierung dargestellt; b) zeigt den Nachweis von CT-spezifischem IgG im Blut nach oraler Immunisierung; c) zeigt den Nachweis von CT-spezifischem IgG im Blut nach subkutaner Immunisierung. In a-c repräsentiert die Y-Achse die Extinktion; in a und b repräsentiert die X-Achse die einzelnen Verdünnungsstufen; d0 = Tag 0 vor der Immunisierung, d10 = 10 Tage nach der Immunisierung.

Wie aus Abb. 2.21 hervorgeht, trägt die Interaktion von MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin nicht zur humoralen IgG-Immunantwort durch zirkulierende Plasmazellen bei. Weder nach oraler Immunisierung noch nach subkutaner Immunisierung sind Unterschiede im CT-spezifischen IgG im Blut der untersuchten Mausmutanten im Vergleich zu WT-Tieren zu beobachten. Jedoch konnte nach oraler Immunisierung sowohl für MAdCAM-1 als auch  $\beta_7$ -Integrin defiziente Tiere im Vergleich zu C57BL/6 Tieren eine schwächere IgA-Immunantwort im Darm ermittelt werden. Für beide Mausmutanten konnte, im Vergleich zu C57BL/6-Tieren, nur ein geringer Titer von IgA im Darm der Tiere bestimmt werden.

Die mit Hilfe der histologischen sowie der Elispot-Analysen gewonnenen Daten stimmen mit den auf Abb. 2.21 gezeigten ELISA-Daten überein; nämlich, dass eine reduzierte Anzahl von IgA-Plasmazellen in beiden untersuchten Mausmutanten einhergeht mit einer beeinträchtigten humoralen IgA-Immunantwort im Darm. Daher scheint die gestörte Migration der Lymphozyten, aufgrund des Fehlens von MAdCAM-1 bzw.  $\beta_7$ -Integrin, die humorale Immunantwort im Darm zu beeinflussen, was sich in einem verringerten IgA-Titer im Fäzes der Tiere äußert.

### 3 Diskussion und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Herstellung und Analyse von Mausmutanten mit gezielten Veränderungen in der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrin Gens sowie die phänotypische Analyse der MAdCAM-1 defizienten Mausmutante.

#### 3.1 Generierung von Mausmutanten mit gezielten Veränderungen im $\beta_7$ -Integrin Gen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde an einem bestehenden Projekt weitergearbeitet. Es lagen bereits vier *Targeting* Vektoren vor, die aus genomischer  $\beta_7$ -Integrin DNA in einem C57BL/6-Hintergrund bestehen (kloniert in einen pBlueskript® II SK<sup>+</sup> Vektor).

In die genomische  $\beta_7$ -Integrin DNA, die die Exone 9 bis 15 des  $\beta_7$ -Integrin Gens umfasst, wurden vier Mutationen eingebracht, die alle die zytoplasmatische Domäne des  $\beta_7$ -Integrins treffen sollten. Mit Hilfe gezielter Mutagenese wurden die Mutationen  $\Delta 61$ , D<sub>736</sub>-R und Y<sub>735</sub>-A in Exon 14 eingeführt und die Mutation  $\Delta 34$  in Exon 15. Zwischen diesen beiden Exonen wurde eine von FRT Sequenzen flankierte Neomycin-Selektionskassette eingeführt, welche der positiven Selektion von homolog rekombinierten ES-Zellklonen dient und aufgrund der vorhandenen FRT Sequenzen später mittels Flp-vermittelter Deletion entfernt werden kann [140].

Mit Hilfe von gezieltem *gene targeting* sollten nun in dieser Arbeit durch das Einbringen der vier verschiedenen *Targeting* Vektoren in murine embryonale Stammzellen spezifische Mutationen im  $\beta_7$ -Integrin Gen etabliert werden. Durch Injektion der veränderten Stammzellen in Blastozysten und anschließende Reimplantation dieser Blastozysten in scheinchwangere Ammen sollten heterozygote Träger der einzelnen Mutationen hergestellt werden, die dann untereinander bis zur Homozygotie verpaart werden, so dass das *in vivo* Studium des veränderten Gens ermöglicht wird.

##### 3.1.1 Umkonstruktion des *Targeting* Vektors mit der Mutation $\Delta 61$ für die Verhinderung von NMD

Die dieser Arbeit vorangehende Diplomarbeit [141] hatte gezeigt, dass die erfolgreiche Etablierung der Mutation  $\Delta 61$  mit dem vorliegenden *Targeting* Vektor nicht möglich ist, da es vermutlich aufgrund der Lage des eingeführten Stopcodons zu einem Abbau der gesamten  $\beta_7$ -Integrin mRNA kommt.

Vermutlich bewirkt ein als NMD (*nonsense mediated mRNA decay*) beschriebener Prozess den post-transkriptionalen Abbau der  $\beta_7$ -Integrin mRNA [143].

Dieser Mechanismus wurde ursprünglich in der Hefe identifiziert und repräsentiert einen phylogenetisch weit-konservierten Spleiß- und Translations-abhängigen Vorgang, wodurch Transkripte mit enthaltenden vorzeitigen Translationsstopcodons eliminiert werden, was die Expression von verkürzten Proteinen verhindert. NMD dient somit in eukaryotischen Zellen zur Qualitätskontrolle der Genexpression. Der mRNA-Abbau durch NMD findet im Zytoplasma statt und ist u.a. abhängig vom Spleißen der Transkripte. Nach dem Spleißen bleiben die Exon-Exon Grenzen durch Proteinkomplexe markiert (sogenannte EJC – *exon junction complex*). Diese Proteinkomplexe werden im Normalfall während der ersten Translationsrunde entfernt. Von den NMD-Proteinen werden Transkripte erkannt, die ein vorzeitiges Translationsstopcodon enthalten, das mehr als 50-55 bp vor der letzten Exon-Exon Grenze liegt, so dass ein oder mehrere EJCs vorliegen. Solche Transkripte können als Folge von Mutationen, alternativem Spleißen oder Fehlern bei der Transkription entstehen [152] [153]. Das für die Mutation  $\Delta 61$  notwendige Stopcodon liegt 78 bp stromaufwärts der nächsten Exon-Exon Grenze. Aufgrund dieser Tatsache haben wir angenommen, dass NMD ursächlich für die Degradierung der  $\beta_7$ -Integrin mRNA sein könnte, einen direkten Beweis dafür gibt es jedoch nicht. Um trotzdem Mausmutanten mit der Mutation  $\Delta 61$  generieren zu können, erfolgte die Umkonstruktion des dafür notwendigen *Targeting* Vektors, indem ein poly(A) Signal direkt hinter das für die Mutation benötigte Stopcodon eingefügt wurde. Als poly(A) Signal wurde das SV40 *late* poly(A) Signal gewählt, da es als besonders starker Terminator der Transkription gilt (persönliche Kommunikation Dr. Martin Hafner). Das inserierte poly(A) Signal bewirkt, dass Exon 14, in dem das Stopcodon für die Mutation lokalisiert ist, in ein terminales Exon verwandelt wird, so dass die Stopmutation nicht als vorzeitiges Codon identifiziert wird und die mRNA nicht dem NMD Prozess unterliegt. Alternativ hätte, durch das Entfernen des Introns zwischen den Exonen 14 und 15 oder durch die Zerstörung der Spleißdonor- und Spleißakzeptorsequenzen an diesen Exonen, die Verhinderung von NMD erzielt werden können, da in beiden Fällen ein Spleißen des Introns nicht stattfinden würde und somit keine EJCs zurückbleiben und das Transkript zum Abbau markieren [154].

#### 3.1.2 Etablierung der Mutationen $\Delta 61$ , $\Delta 34$ , D-R und Y-A in ES-Zellen

Mittels gezieltem *gene targeting* konnten die vier in der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrin Gens lokalisierten Mutationen in F1 ES-Zellen etabliert werden. Mit Hilfe von Southern Blot und PCR wurden insgesamt 7268 Klone analysiert, von denen 19 als homolog rekombinierte ES-Zellklone mit einer durchschnittlichen Frequenz von 0,4 % detektiert werden konnten. Bei 18 der 19 ES-Zellklone handelt es sich um ES-Zellen der Linie F1 (siehe Ergebnisse Tab. 2.1). Eine mögliche Ursache für die bessere Rekombination der *Targeting* Vektoren in diesen ES-Zellen (für IB10.1 Frequenz von 0,096 %, für F1 eine Frequenz im Schnitt von 0,45 %) ist die Isogenität der DNA. F1 ES-Zellen stammen aus der ersten Generation der Verpaarung von C57BL/6- und 129SV-Mäusen und tragen somit ein C57BL/6-Allel. Die  $\beta_7$ -Integrin *Targeting* Vektoren bestehen aus C57BL/6-DNA und es wurde vielfach beschrieben, dass die Verwendung von isogener DNA die Frequenz der homologen Rekombination mit dem Ziellocus erhöht [144]. Dieses könnte erklären, warum lediglich ein homolog rekombinierter IB10.1 ES-Zellklon (129SV-Hintergrund) detektiert werden konnte.

Zum Screenen auf positive ES-Zellklone wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit eine PCR-Strategie entwickelt, die die Detektion deutlich vereinfacht und im Gegensatz zur Analyse mittels Southern Blot weniger zeitaufwendig ist. Durch die Wahl der Primer für die PCR, dem *sense*-Primer welcher im Neo<sup>R</sup>-Gen lokalisiert ist und dem *antisense*-Primer außerhalb der genomischen Sequenz des *Targeting* Vektors, ist zudem der Nachweis für eine ortsspezifische Integration des *Targeting* Vektors gewährleistet. Der größte Vorteil der Analyse mittels PCR ist allerdings neben ihrer hohen Sensitivität, die geringe Menge an einzusetzender genomischer DNA, während für die Analyse mittels Southern Blot DNA-Mengen von mindestens 5  $\mu$ g benötigt werden. Diese Tatsache könnte eine Erklärung dafür liefern, warum beim anfänglichen Screenen mittels Southern Blot nur ein positiver ES-Zellklon detektiert werden konnte.

Nachdem alle geplanten Mutationen erfolgreich in F1 ES-Zellen etabliert werden konnten, wurden diese genetisch veränderten Zellen entweder direkt für die Injektion in Blastozysten verwendet oder es wurde für einige der Klone vorab eine Plasmid-vermittelte *in vitro* Deletion des Neomycin-Resistenzgens durchgeführt (siehe Ergebnisse Tab. 2.2). Dies ersparte eine spätere, weit zeitaufwendigere Verpaarung der chimären Mäuse mit Flp-Deletermäusen.

#### **3.1.3 Generierung von Mausmutanten mit den Mutationen $\Delta 34$ , $\Delta 61$ sowie D-R in der zytoplasmatischen Domäne des $\beta_7$ -Integrin Gens**

Nach Blastozysteninjektionen der in Tab. 2.2 (siehe Ergebnisse) aufgeführten ES-Zellklone, konnte durch die Verpaarung der entstandenen chimären Tiere mit WT-Tieren für fünf Klone mit den Mutationen  $\Delta 61$ ,  $\Delta 34$  und D-R Keimbahntransmission nachgewiesen werden. Für das weitere Vorgehen wurden heterozygote Nachkommen aus diesen Rückkreuzungen untereinander bis zur Homozygotie verpaart, um die Auswirkungen der einzelnen Mutationen *in vivo* studieren zu können.

Bisher konnte für keinen der vier Klone mit der Mutation Y-A eine Keimbahntransmission gezeigt werden. Insgesamt neun chimäre Tiere, die aus den Injektionen der vier Y-A Klone hervorgegangen sind, werden weiterhin mit C57BL/6-Wildtyptieren zurückgekreuzt. Parallel werden die Nachkommen aus diesen Verpaarungen mit Hilfe von PCR auf Keimbahntransmission des veränderten Klon überprüft. Ein kritischer und für die Erzeugung von Mäusen notwendiger Parameter ist die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status der ES-Zellen während des gesamten Zellkulturprozesses. Ausschließlich unter optimalen Bedingungen bleibt die Pluripotenz der ES-Zellen erhalten, so dass diese in der Lage sind später zur Entwicklung sämtlicher Gewebe der Maus, einschließlich der Keimzellen beizutragen.

Der Grad des Chimärismus beträgt im Durchschnitt für alle chimären Tiere aus den Injektionen der Y-A Klone lediglich ca. 25 %. Im Gegensatz dazu konnte für chimäre Tiere aus den Injektionen der  $\Delta 61$ ,  $\Delta 34$  und D-R Klone ein Chimärismus zwischen 50-90 % beobachtet werden. Wahrscheinlich haben suboptimale Zellkulturbedingungen während der Kultur der Y-A Klone den Verlust der Pluripotenz der ES-Zellen mit sich geführt, so dass die Keimbahntransmission dieser Klone nicht erfolgen konnte.

#### **3.2 Phänotypische Analyse der Auswirkungen der Mutationen $\Delta 34$ , D-R und $\Delta 61$ in Lymphozyten**

In dieser Arbeit sollte die Rolle der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins untersucht werden, insbesondere ob eine Signalübertragung durch die zytoplasmatische Domäne für die Migration von Lymphozyten notwendig ist. Hierzu sollen Mausmutanten mit gezielten Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins erzeugt und analysiert werden. Diese sollen eine Aufgliederung der zytoplasmatischen Domäne bewirken, um somit regulatorische Elemente innerhalb der Domäne oder einzelne für die Signaltransduktion essentielle AS identifizieren zu können.

In zahlreichen Studien konnte erst mit Hilfe solcher Deletions- und Punktmutationsanalysen die funktionale Relevanz bestimmter Bereiche der



zytoplasmatischen Domänen bei den durch Integrinen vermittelten Funktionen gezeigt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, welche Auswirkungen die jeweiligen Mutationen sowohl für die Expression von  $\beta_7$ -Integrin auf Lymphozyten als auch auf den Aufbau von spezifischen lymphatischen Organen des GALT haben.

#### **3.2.1 Expressionsanalyse von $\beta_7$ -Integrin sowie $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf Lymphozyten von $\Delta 34$ , D-R und $\Delta 61$ Mausmutanten**

Nachdem homozygote Träger der Mutationen  $\Delta 34$ , D-R und  $\Delta 61$  identifiziert werden konnten, wurden als erstes FACS-Analysen durchgeführt, in denen sowohl die Expression von  $\beta_7$ -Integrin als auch von  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf der Oberfläche von Lymphozyten untersucht wurde. Hierbei stellte sich heraus, dass es aufgrund der Mutationen zu unterschiedlichen Expressionsprofilen für  $\beta_7$ -Integrin und  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf Lymphozyten kommt.

#### ***Reduktion der $\beta_7$ -Integrin und $\alpha_E\beta_7$ -Integrin Expression auf Lymphozyten von $\Delta 34$ B11 Mutanten***

Für Mutanten beider  $\Delta 34$  B11-Linien konnte in dieser ersten Analyse der Verlust der besonders stark  $\beta_7$ -Integrin exprimierenden Population (*bright*-Population) beobachtet werden (siehe Ergebnisse Abb. 2.9 – 2.11). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Reduktion in der  $\beta_7$ -Integrin Expression anscheinend einen Einfluss auf die Heterodimerbildung mit  $\alpha_E$ -Integrin hat (siehe Ergebnisse Abb. 2.12).

Vermutlich hat die durch die Mutation  $\Delta 34$  hervorgerufene Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins Auswirkungen auf die Expression der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Eventuell kommt es aufgrund der Mutation zu Strukturveränderungen innerhalb des Proteins, die die korrekte Faltung und somit die Expression auf der Zelloberfläche negativ beeinflussen. Solch eine Strukturveränderung könnte mit sich führen, dass das Integrin eine geschlossene, also inaktive Konformation einnimmt oder dass es zu einem Stabilitätsverlust der aktiven Konformation kommt, in der es von dem spezifischen AK nicht mehr gebunden werden kann. Wie aus Abb. 1.13 in Abschnitt 1.5 der Einleitung hervorgeht, verursacht die Mutation  $\Delta 34$  die Deletion der 34 C-terminalen AS inklusive des hoch-konservierten NPxY/F-Motifs, welches die zytoplasmatische Domäne von  $\beta$ -Integrinen in einen proximalen und einen distalen Bereich unterteilt. Schon 1989 konnte für das  $\beta_1$ -Integrin gezeigt werden, dass dieses Motif ein Substrat für Tyrosin-Phosphorylierungen *in vivo* darstellt [155] und dass es zur Lokalisierung von Integrinen in Fokalkontakten beiträgt [156].

Anhand der Untersuchungen der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_1$ -Integrins wurde postuliert, dass das NPxY/F-Motif dafür verantwortlich ist, dass die zytoplasmatische Domäne eine gefaltete Konformation einnehmen kann, die die proximale und distale Region in Juxtaposition bringt. Durch *in vitro* Studien konnte 1994 von Crowe und Kollegen gezeigt werden, dass die Eliminierung der distalen Region der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins und die stabile Expression dieses verkürzten Proteins in murinen B-Zellen den kompletten Verlust der Ligandenbindungsfähigkeit des Rezeptors verursacht [114]. Allerdings war die Lokalisierung des Integrins auf der Zelloberfläche sowie die Heterodimerbildung mit  $\alpha_4$ - oder  $\alpha_E$ -Integrin nicht durch den Verlust der distalen Region beeinträchtigt. Daher wurde vermutet, dass es durch die Eliminierung der distalen Region von  $\beta_7$ -Integrin zu einer Zerstörung eines essentiellen regulatorischen Elements kommt und dass der Verlust der Ligandenbindungsaktivität nicht auf eine Konformationsänderung des Rezeptors zurückzuführen ist. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten weisen allerdings darauf hin, dass aufgrund der fehlenden distalen Region im  $\beta_7$ -Integrin eine Konformationsänderung im Rezeptor verursacht wird, die die Lokalisierung des Rezeptors auf der Lymphozytenoberfläche sowie die Heterodimerbildung mit  $\alpha_E$ -Integrin beeinflusst. Sie repräsentieren im Gegensatz zu den von Crowe und Kollegen erhobenen Daten die tatsächliche Auswirkung der Mutation *in vivo*.

#### ***Normale Expression des $\beta_7$ -Integrins auf Lymphozyten von $\Delta 34$ G5 Mutanten***

Überraschenderweise zeigten Mutanten der Linie  $\Delta 34$  G5, in denen ebenfalls wie für  $\Delta 34$  B11 Mutanten die eingeführte Mutation zum Verlust der 34 C-terminalen AS führt, im Vergleich zu heterozygoten Geschwistertieren sowie zu C57BL/6-Wildtyptieren keinen Unterschied in ihrer  $\beta_7$ -Integrin Expression (siehe Ergebnisse Abb. 2.9 – 2.11). Auch konnte für die Expression des  $\alpha_E$ : $\beta_7$ -Integrin Heterodimers in Mutanten dieser Linie kein Unterschied zu den Kontrollen festgestellt werden (siehe Ergebnisse Abb. 2.12). Unsere erste Vermutung bezüglich dieses Unterschiedes im Verhalten der drei  $\Delta 34$ -Linien war, dass bei G5-Mutanten möglicherweise eine Punktmutation oder eine Leserasterverschiebung dazu geführt haben könnte, dass das eingeführte Stopcodon verändert wurde und es somit nicht zum vorzeitigen Abbruch der Translation durch die Mutation  $\Delta 34$  kommen konnte. Durch Sequenzierungen (Daten nicht gezeigt) konnte allerdings nachgewiesen werden, dass in allen  $\Delta 34$ -Linien das Stopcodon korrekt ins Genom eingeführt wurde. Trotz alledem könnten unerwünschte Mutationen, die sich bereits im ES-Zellstadium manifestiert haben, dazu geführt haben, dass die

Auswirkungen der eingebrachten Mutation  $\Delta 34$  bei G5-Mutanten *in vivo* nicht identifiziert werden konnten.

Aufgrund dieser Tatsache kann über die Unterschiede zwischen den einzelnen  $\Delta 34$ -Linien nur spekuliert werden. Möglicherweise führen, neben unerwünschten bereits im ES-Zellstadium etablierten Mutationen, unterschiedliche genetische Hintergründe der einzelnen  $\Delta 34$ -Linien zu den beobachteten Abweichungen in der  $\beta_7$ -Integrin Expression auf Lymphozyten. Da Mutanten der  $\Delta 34$  G5-Linie, im Gegensatz zu Mutanten der beiden B11-Linien, nicht mehrere Generationen mit C57BL/6-Wildtyptieren zurückgekreuzt wurden, tragen sie im Vergleich zu Tieren der Linie  $\Delta 34$  B11 noch einen großen Anteil an 129SV-Allelen. Allerdings müssten, um diese Vermutung zu bestätigen, weitere Analysen durchgeführt werden, in denen C57BL/6- und 129SV-Wildtypiere bezüglich ihres  $\beta_7$ -Integrin Expressionsprofils verglichen werden.

#### ***Deutliche Reduktion der $\beta_7$ -Integrin und $\alpha_E\beta_7$ -Integrin Expression auf Lymphozyten von D-R Mutanten***

Im Vergleich zu homozygoten  $\Delta 34$  B11 Mutanten konnte für Mutanten der Linie D-R eine wesentlich deutlichere Reduktion der  $\beta_7$ -Integrin Expression auf der Oberfläche der Lymphozyten beobachtet werden (siehe Ergebnisse Abb. 2.9 – 2.11). Dieser Verlust in der Expression beschränkt sich nicht, wie für Mutanten der  $\Delta 34$  B11-Linien auf eine kleine Population von Lymphozyten, sondern betrifft eine größere Anzahl an Lymphozyten. Wie dann in Analysen der  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin Expression gezeigt werden konnte, scheint die deutliche Abnahme in der  $\beta_7$ -Integrin Expression bei D-R Mutanten einen erheblichen Einfluss auf die Heterodimerbildung zu haben (siehe Ergebnisse Abb. 2.12). Die Mutation D-R, die den Austausch von Asparaginsäure an Position 736 gegen Arginin verursacht, befindet sich im hoch-konservierten LLv-iHDR-Motif und wurde 1996 bereits in die zytoplasmatische Domäne des  $\beta_3$ -Integrins eingeführt [102]. Das Membran-proximale Motif GFFKR in der zytoplasmatischen Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit ist bei allen Integrinen konserviert (siehe Einleitung Abb. 1.11). Durch die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen dem Arginin (R) in diesem Motif und dem Aspartatrest (D) im LLv-iHDR in der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta$ -Untereinheit wird das Integrin in einer inaktiven Konformation gehalten. Daher dient das GFFKR-Motif als negativ-regulatorische Sequenz indem es die Integrin-Aktivierung unterdrückt. Eliminierungen dieses Motifs führten daher zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor, der nicht mehr reguliert werden kann [117] [157]. Erwartungsgemäß führte auch die Mutation D-R in der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_3$ -Integrins zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor. Die durch den Austausch

von Aspartat gegen Arginin herbeigeführte Ladungsinversion zerstörte die Salzbrücke und damit die Verbindung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit.

Sie bewirkte konstitutives *outside-in signalling* und zeigte, dass eine Liganden-unabhängige Rekrutierung des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins zu Fokalkontakten stattfindet [102].

Im Jahr 2006 konnte von Krissansen und Kollegen eine als CARD (*cell adhesion regulatory domain*)-Domäne bezeichnete Membran-proximale Sequenz im  $\beta_7$ -Integrin identifiziert werden, die eine kritische Rolle für die adhäsiven Funktionen und das *clustern* des  $\beta_7$ -Integrins darstellt. Wie man auf Abb. 1.12 in der Einleitung sehen kann, ist diese CARD-Domäne (AS: 735-YDRREY-740), die Teil des hoch-konservierten LLv-iHDR-Motifs ist, ausschließlich bei  $\beta_7$ -Integrinen zu finden. Mit Hilfe von Adhäsionstests konnten die Autoren in ihren Studien zeigen, dass diese kurze Sequenz von sechs AS zum *clustern* von  $\beta_7$ -Integrin auf der Zelloberfläche beiträgt und so die Adhäsion an MAdCAM-1 vermittelt. Des Weiteren konnte u.a. durch *pull-down assays* nachgewiesen werden, dass dieses Motif durch die Kinasen FAK und src gebunden und phosphoryliert wird. Es zeigte sich, dass für die Bindung von src nur die Kernsequenz DRRE notwendig ist und nicht die flankierenden Tyrosine. Aufgrund dieser Tatsachen, wurde von den Autoren die Vermutung aufgestellt, dass eventuell mit Hilfe von zytoplasmatischen Kinasen eine indirekte Bindung des  $\beta_7$ -Integrins zum Zytoskelett hergestellt wird [138].

Die Mutation D-R, die in dieser Arbeit in Mäusen etabliert werden konnte, befindet sich in der von Krissansen und Kollegen identifizierten Domäne. Aufgrund des ausgetauschten Aspartatrests gegen Arginin könnte eventuell die Bindung von src nicht mehr möglich sein, so dass die indirekte Verbindung zum Zytoskelett nicht hergestellt werden kann. Möglicherweise wäre aufgrund dessen ein *clustern* des  $\beta_7$ -Integrins auf der Zelloberfläche nicht mehr gewährleistet, so dass die Avidität des Rezeptors an seinen endothelialen Liganden MAdCAM-1 beeinträchtigt wäre. Unsere Daten zeigen für homozygote D-R Mutanten eine deutliche Reduktion in der  $\beta_7$ -Integrin Expression auf der Zelloberfläche. Diese Expressionsabnahme lässt sich eventuell damit erklären, dass das Integrin aufgrund der Mutation nicht mehr in der Lage ist sich auf der Lymphozytenoberfläche anzuhäufen. Anhand der gezeigten Daten kann bis jetzt allerdings noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Mutation einen Einfluss auf den Aktivierungszustand des  $\beta_7$ -Integrins hat und ob das Integrin konstitutiv aktiv exprimiert wird. Allerdings könnte die aufgrund der Mutation eventuell zerstörte Verbindung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit eine Erklärung dafür liefern, warum bei D-R Mutanten die Heterodimerbildung des  $\beta_7$ -Integrins mit  $\alpha_E$ -Integrin gestört ist.

#### ***Kompletter Verlust der $\beta_7$ -Integrin sowie $\alpha_E\beta_7$ -Integrin Expression auf Lymphozyten der $\Delta 61$ Mutanten***

Ein kompletter Verlust der  $\beta_7$ -Integrin Expression zeigte sich für homozygote Tiere der beiden  $\Delta 61$ -Linien. Genau wie bei  $\beta_7$ -Integrin defizienten Tiere konnte hier keine Expression des Rezeptors auf der Oberfläche der Lymphozyten nachgewiesen werden. Auch über diesen beobachteten Phänotyp kann nur spekuliert werden. Falls der NMD-Prozess tatsächlich die Ursache für die Degradierung der gesamten  $\beta_7$ -Integrin mRNA bei der  $\Delta 61$ -Mausmutante war, die vor dieser Arbeit generiert und analysiert wurde und falls mit Hilfe des umkonstruierten  $\Delta 61$  *Targeting* Vektors dieser Prozess in der neu generierten  $\Delta 61$ -Mausmutante verhindert werden konnte, müssen nun andere Ursachen für die nicht-vorhandene  $\beta_7$ -Integrin Expression ins Auge gefasst werden. Vielfach konnte beschrieben werden, dass es aufgrund von Deletionen auf DNA-Ebene zur Instabilität der mRNA kommen kann. Deletionen, die nicht aus einem Vielfachen von drei, d.h. von einem für eine AS kodierenden Triplett bestehen, verschieben den Leserahmen für die Proteinsynthese. Dadurch kann es stromabwärts zu Stopcodons kommen und damit zum Abbruch der Proteinsynthese. Auch gibt es Hinweise dafür, dass bereits eine derart veränderte mRNA instabil ist und abgebaut wird [158] [159].

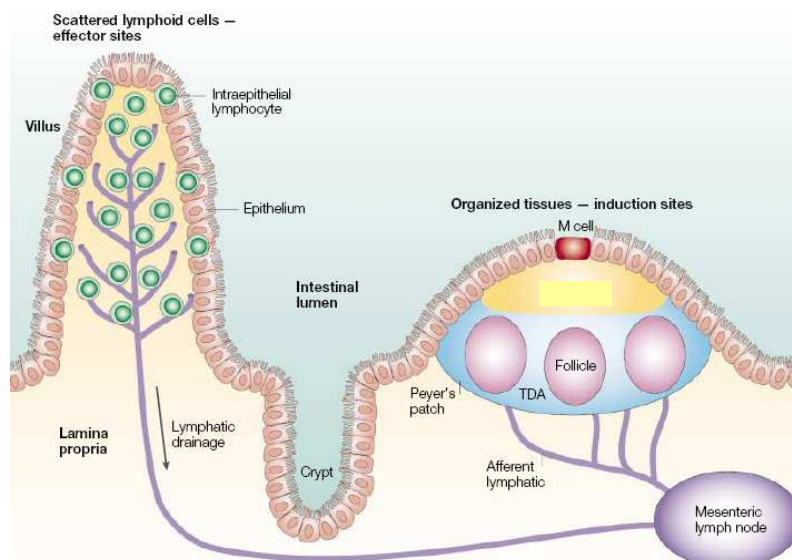
Des Weiteren könnte das  $\beta_7$ -Integrin aufgrund der fehlenden zytoplasmatischen Domäne anders gefaltet sein, so dass es deshalb vom AK nicht mehr detektiert werden kann. Es könnte auch sein, dass die fehlende Domäne einen kompetitiven Effekt bei der Heterodimerbildung der Integrine auslöst, der bewirkt, dass  $\alpha_4$ -Integrin eine stabilere Assoziation mit  $\beta_1$ -Integrin ausbilden kann, als mit dem durch die Mutation verkürzten  $\beta_7$ -Integrin. Das könnte dann zur Folge haben, dass  $\beta_7$ -Integrine ein höheres *turnover* auf der Zelle hätten, so dass sie nur für eine kurze Zeit auf der Zelle exprimiert würden und somit nicht nachgewiesen werden könnten. Weiterhin könnte es auch aufgrund der strukturellen Veränderung durch den Verlust der zytoplasmatischen Domäne zu einer Degradierung des Proteins kommen. 2003 wurde von Goldberg und Kollegen beschrieben, dass strukturell veränderte Proteine durch proteasomale Degradierung zerstört werden können [160]. In der schon zitierten Veröffentlichung von Crowe und Kollegen führte das komplette Entfernen der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins und die anschließende stabile Expression in einer murinen B-Zelllinie zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor und einer hohen Avidität für alle bekannten Liganden. Des Weiteren konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass das Fehlen der zytoplasmatischen Domäne nicht die Fähigkeit des Integrins beeinflusst auf der Zelloberfläche exprimiert zu werden oder Heterodimere mit  $\alpha_4$ -Integrinen zu bilden [114]. Im Gegensatz dazu weisen die von uns gewonnenen Daten darauf hin, dass das Entfernen der zytoplasmatischen Domäne des

$\beta_7$ -Integrins sowohl die Fähigkeit des Rezeptors beeinträchtigt auf der Zelloberfläche exprimiert zu werden als auch Heterodimere mit den entsprechenden  $\alpha$ -Integrinen formieren zu können. Jedoch muss auch an dieser Stelle erneut angemerkt werden, dass die in dieser Arbeit gezeigten Daten den *in vivo* Zustand repräsentieren und ein Vergleich mit der von Crowe und Kollegen durchgeführten Studie daher nur bedingt möglich ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die verschiedenen in dieser Arbeit analysierten  $\beta_7$ -Integrin Mausmutanten hinsichtlich ihrer  $\beta_7$ -Integrin Expression grob in drei Gruppen unterteilt werden können: eine normale  $\beta_7$ -Integrin Expression auf Lymphozytenoberfläche konnte für  $\Delta 34$  G5 Mutanten beobachtet werden; eine geringe – deutlichere Reduktion der  $\beta_7$ -Integrin Expression zeigte sich für  $\Delta 34$  B11 und D-R Mutanten; der komplette Verlust der Expression des Integrins konnte dagegen für homozygote  $\Delta 61$  Mutanten gezeigt werden.

### 3.2.2 Qualitative und quantitative Analyse der Peyer'schen Platten von $\Delta 34$ , D-R und $\Delta 61$ Mutanten

$\beta_7$ -Integrine werden ausschließlich auf Lymphozyten exprimiert, die in die intestinale Mukosa rezirkulieren. Als sogenannter *homing*-Rezeptor ist  $\beta_7$ -Integrin mit seinem endothelialen Liganden MAdCAM-1 dafür verantwortlich, dass Lymphozyten in die induktiven Kompartimente des GALT geleitet werden, um dort auf Antigene, hauptsächlich präsentiert durch DCs, zu treffen, so dass eine spezifische Immunantwort ausgelöst werden kann. Zu den induktiven Kompartimenten des GALT zählen die PPs, die MLNs sowie Lymphfollikel im Dickdarm, die vom Aufbau und der Funktion vergleichbar mit den PPs im Dünndarm sind [161]. Das Effektorkompartiment des GALT dagegen setzt sich aus den Lymphozyten der Lamina Propria und den IELs zusammen [162].



**Abb. 3.1: Schematische Darstellung der lymphatischen Elemente im intestinalen Immunsystem.**

Die organisierten lymphatischen Gewebe der PPs und MLNs stellen die induktive Seite des GALT dar, wohingegen das Effektorkompartiment von LPLs und IELs gebildet wird. (abgewandelt nach Mowat [161]).



PPs als organisierte lymphatische Gewebe findet man an der antimesenterialen Seite des Darms. Sie setzen sich zusammen aus einem spezialisierten Follikel-assoziierten Epithel, B- und T-Zell-Follikeln sowie interfollikulären Regionen mit HEVs, über die Lymphozyten aus dem Blut in die PPs einwandern.

Von Wagner und Kollegen konnte 1996 gezeigt werden, dass  $\beta_7$ -Integrin defiziente Tiere drastisch verkleinerte PPs aufweisen. Zwar ist bei diesen Knockout-Tieren eine normale Anzahl an PPs im Dünndarm zu finden, doch weisen diese eine verminderte Zellularität und rudimentäre Follikel auf [35]. Aufgrund der fehlenden Expression des Adhäsionsmoleküls auf ihrer Oberfläche sind Lymphozyten nicht in der Lage aus dem Blutstrom an den Wänden der HEVs entlang zu rollen und in das darunterliegende Gewebe der PPs einzuwandern. Anhand dieses Phänotyps wird die Bedeutung des  $\beta_7$ -Integrins für die Aufrechterhaltung der mukosalen Immunität deutlich.

Falls die eingebrachten Veränderungen in der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins einen Einfluss auf die Migration der Lymphozyten haben, könnte dieser Phänotyp eventuell im Aufbau und der Größe der PPs sichtbar werden. Die Analyse der PPs der  $\Delta 34$  und D-R Mutanten zeigte, dass bezüglich der Anzahl, des Aufbaus und der Größe der PPs keine offensichtlichen Unterschiede zu heterozygoten Geschwistertieren oder C57BL/6-Wildtyptieren bestehen (siehe Ergebnisse Abb. 2.13). Homozygote  $\Delta 61$  Mutanten hingegen weisen eine mittlere Anzahl von 1,4 PPs pro Dünndarm auf, erheblich weniger als ihre heterozygoten Geschwistertiere (6 PPs pro Dünndarm) (Daten nicht gezeigt).

Zur genaueren Größenbestimmung wurden die PPs der einzelnen Mausmutanten vermessen (siehe Ergebnisse Abb. 2.14). Auch hier konnten für  $\Delta 34$  und D-R Mutanten keine signifikanten Unterschiede zu den heterozygoten Geschwistertieren und C57BL/6-Wildtyptieren festgestellt werden. Diese Analyse steht bei den  $\Delta 61$  Mutanten noch aus, doch ein durch das Auge erfassbarer deutlicher Größenunterschied zwischen den PPs von Mutanten und Kontrolltieren konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Aufgrund der gewonnenen Daten nehmen wir an, dass die in die zytoplasmatische Domäne eingebrachten Mutationen  $\Delta 34$  und D-R keinen Einfluss auf die Ansiedelung von  $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup>-Lymphozyten in PPs haben. Anscheinend sind Lymphozyten dieser Mausmutanten wie die Lymphozyten von Kontrolltieren immer noch in der Lage, über die HEVs durch die Interaktion mit MAdCAM-1 in das lymphatische Gewebe einzuwandern.



Falls die Mutation  $\Delta 61$  tatsächlich in den analysierten Mausmutanten etabliert werden konnte und keine Degradierung des  $\beta_7$ -Integrins auf RNA- oder Protein-Ebene stattgefunden hat, scheint das Fehlen der kompletten zytoplasmatischen Domäne einen Einfluss auf die Anzahl der PPs im Darm zu haben. Über die Ursache hierfür kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Eventuell kommt es aufgrund der Mutation  $\Delta 61$  zu einer Akkumulation der Lymphozyten, so dass diese nicht mehr in die lymphatischen Gewebe der PPs einwandern können.

#### 3.2.3 Ausblick

Anhand der gezeigten Daten konnten die eingangs gestellten Fragen bisher nur teilweise beantwortet werden. Die bereits beobachteten Phänotypen der erzeugten Mausmutanten sind komplex und bedürfen weiterer Analysen:

für homozygote  $\Delta 34$  Mutanten sollte herausgefunden werden, ob das Fehlen der distalen Region einen Einfluss auf die Konformation des Rezeptors auf der Zelloberfläche hat. Außerdem sollte durch *in vitro* Migrationsassays herausgefunden werden, ob es durch die Mutation zu einem Verlust der Ligandenbindung kommt.

Für homozygote Mutanten der Linie D-R sollte die Frage geklärt werden, ob aufgrund der Mutation ein *clustern* des  $\beta_7$ -Integrins auf der Lymphozytenoberfläche noch möglich ist und ob der Aktivierungszustand des Integrins beeinflusst wird. Mit Hilfe von Analysen in denen der Phosphorylierungszustand spezifischer Kinasen (z.B. FAK oder src) überprüft wird, könnten die Fragen beantwortet werden, ob ein konstitutiv aktiver Rezeptor durch die Mutation entstanden ist und ob *outside-in signalling* auf das von  $\beta_7$ -Integrin vermittelte Einwanderungsverhalten der Lymphozyten einen Einfluss hat. Des Weiteren könnten auch hier *in vitro* Migrationsassays einen eventuellen Einfluss der Mutation D-R auf die Ligandenbindungsfähigkeit des  $\beta_7$ -Integrins identifizieren.

Um weiterhin eine Phänotypisierung der  $\Delta 61$ -Mutante vornehmen zu können, muss als erstes die Frage geklärt werden, ob eventuell eine Degradierung auf RNA- oder Protein-Ebene den beobachteten Phänotyp verursacht hat. Mit Hilfe von Northern Blot oder RT-PCR könnte der Abbau der  $\beta_7$ -Integrin mRNA nachgewiesen werden. Würde sich allerdings herausstellen, dass eine Degradierung auf RNA-Ebene nicht stattfindet, könnte überprüft werden, ob aufgrund der Deletion der zytoplasmatischen Domäne eine strukturelle Veränderung im  $\beta_7$ -Integrin verursacht wurde, die zu einer Degradierung des Proteins durch Proteasomen führt. Mit Hilfe des Proteasomen-Inhibitors Epoxomicin könnte schließlich nachgewiesen werden, ob eine proteasomale Degradierung des Proteins stattfindet [163]. In diesem Fall würde nach der Behandlung von  $\Delta 61$ -Lymphozyten mit Epoxomicin die Oberflächenexpression von  $\beta_7$ -Integrin wiederhergestellt

sein. Trotz alledem sollte nach der ersten qualitativen Analyse der PPs von  $\Delta 61$  Mutanten eine histologische Analyse Aufschluss über Aufbau und Größe der PPs geben. Auch hier sollen eventuelle Unterschiede in der Größe der PPs genau quantifiziert werden.

Generell sollte für zukünftige Analysen aller Mausmutanten herausgefunden werden, ob der in der FACS-Analyse verwendete anti- $\beta_7$ -Integrin AK die aktive oder inaktive Konformation des  $\beta_7$ -Integrins detektiert. Des Weiteren soll in nächster Zukunft ein funktionaler AK für die FACS-Analyse getestet werden, der für die Analyse der  $\alpha_4$ -Integrin Expression eingesetzt werden kann. Da sowohl bei  $\Delta 34$  als auch bei D-R Mutanten die Heterodimerbildung mit  $\alpha_E$ -Integrin beeinflusst ist, wird es interessant sein herauszufinden, ob die Heterodimerbildung mit  $\alpha_4$ -Integrin ebenfalls durch die Mutationen beeinflusst wird. Außerdem sollen mit Hilfe spezifischer AK gegen Oberflächenmarker immunhistochemische Analysen durchgeführt werden, in denen die Verteilung von T- und B-Zellen in der intestinalen Mukosa der Mausmutanten untersucht wird, um zu überprüfen, ob die in die zytoplasmatische Domäne des  $\beta_7$ -Integrins eingebrachten Mutationen einen Einfluss auf die Lokalisierung von T- und B-Zellen in der intestinalen Lamina Propria haben.

#### **3.3 Analyse der MAdCAM-1 defizienten Mausmutante**

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der MAdCAM-1 defizienten Mausmutante der Einfluss dieses Adhäsionsmoleküls bei lymphozytärer Migration sowie bei der humoralen Immunantwort analysiert. Das mukosale vaskuläre Adressin MAdCAM-1 gehört zur Superfamilie der Immunglobuline und wird konstitutiv in Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben exprimiert (postkapillare Venolen der Lamina Propria, HEVs der PPs und MLNs sowie der Milz) [32] [82] [83]. Als Liganden für MAdCAM-1 dienen L-Selektin und das Integrin  $\alpha_4\beta_7$ , die beide auf Lymphozyten exprimiert werden, die in das lymphatische Gewebe des Darms rezirkulieren.

Mit Hilfe der  $\beta_7$ -Integrin defizienten Maus konnte 1996 von Wagner und Kollegen die Bedeutung dieses *homing*-Rezeptors sowohl für die Rekrutierung von Lymphozyten in das GALT als auch für den Aufbau des GALT identifiziert werden. Das Fehlen von  $\beta_7$ -Integrin auf Lymphozyten führt zu einer drastischen Reduktion der PPs, sowie einer Reduktion der IgM<sup>+</sup>- und IgA<sup>+</sup> B-Zellen und Plasmazellen in der Lamina Propria des Darms. Des Weiteren konnte durch Adhäsions- und Migrationstests gezeigt werden, dass sowohl die Bindungsfähigkeit von Lymphozyten in  $\beta_7$ -Integrin defizienten Mäusen an HEVs als auch die Migrationsfähigkeit dieser Lymphozyten in PPs stark beeinträchtigt ist [35].

Die Analyse von L-Selektin defizienten Mäusen zeigte, dass dieser zweite Ligand von MAdCAM-1 unentbehrlich für die Adhäsion von Lymphozyten an HEVs der PLN ist. Folglich geht mit diesem Adhäsionsdefekt eine drastische Reduktion der Lymphozytenanzahl in den PLNs einher. Durch *in vivo* Migrationsexperimente konnte zudem gezeigt werden, dass L-Selektin am *homing* der Lymphozyten zu den PPs und der Milz involviert ist [8], auch unter inflammatorischen Bedingungen [164]. Überraschenderweise ist sowohl in  $\beta_7$ -Integrin als auch in L-Selektin defizienten Mäusen die Formierung der MLNs nicht beeinträchtigt. Anscheinend findet hier eine Kompensierung des jeweils fehlenden Rezeptors durch die Interaktion des noch vorhandenen Rezeptors mit dem entsprechenden Liganden (MAdCAM-1) statt. Diese Hypothese konnte durch die Generierung von Doppelmutanten bestätigt werden, die sowohl für  $\beta_7$ -Integrin als auch für L-Selektin defizient sind. Im Gegensatz zu den Einzelmutanten, sind  $\beta_7$ -Integrin / L-Selektin defiziente Lymphozyten nicht in der Lage in die MLNs zu migrieren. Aufgrund dessen war die Formierung der MLNs in diesen Doppelmutanten erheblich gestört [165].

Anhand der in unserem Labor durch gezieltes *gene targeting* generierten MAdCAM-1 defizienten Mausmutante wurde nun in dieser Arbeit die *in vivo* Rolle des Adressins bei den geschilderten Prozessen analysiert.

#### **3.3.1 MAdCAM-1 beeinflusst den Aufbau und die Größe der Peyer'schen Platten**

MAdCAM-1 wird u.a. auf den HEVs der PPs exprimiert und dient dort migrierenden  $\alpha_4\beta_7$ -exprimierenden Lymphozyten als endothelialer Ligand. Um zu überprüfen, ob das Fehlen von MAdCAM-1 auf den HEVs der PPs einen Einfluss hat auf die Morphologie und Größe der PPs, wurden histologische Techniken angewandt. Dabei stellte sich heraus, dass die PPs von MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutanten drastisch reduziert sind. Bezüglich der Größe der PPs bestehen signifikante Unterschiede zwischen MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  und C57BL/6-Wildtyptieren (siehe Ergebnisse Abb. 2.16). Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von MAdCAM-1 eine ca. 60 %ige Reduktion in der Größe der PPs verursacht. Zudem konnte durch HE-Färbungen gezeigt werden, dass die stark verkleinerten PPs eine verminderte Zellularität sowie eine geringere Anzahl an T- und B-Zell Follikeln aufweisen (siehe Ergebnisse Abb. 2.15). Hieraus wird deutlich, dass MAdCAM-1, wie sein lymphozytärer Rezeptor  $\beta_7$ -Integrin, eine entscheidende Rolle beim Aufbau lymphatischer Organe des GALT spielt. Anscheinend sind aufgrund des Fehlens von MAdCAM-1 die aus dem Blutstrom einwandernden Lymphozyten nicht mehr in der Lage auf dem hohen Endothel der PPs zu adhären. Somit kann die nachfolgende Transmigration in das darunterliegende Gewebe nicht stattfinden, und eine Ansiedelung von Lymphozyten in den PPs wird verhindert.

Da jedoch die Deletion von MAdCAM-1 nicht zu einem kompletten Verlust der PPs führt, sondern nur zu einer erheblichen Reduktion in der Größe, müssen die Interaktionen anderer Adhäsionsmoleküle ebenfalls an der Rekrutierung von Lymphozyten in die organisierten Gewebe des GALT beteiligt sein. Zu nennen ist an dieser Stelle die Interaktion von VCAM-1, das in einem geringen Ausmaß auch auf HEVs der PPs exprimiert wird [166], mit den lymphozytären Integrinen  $\alpha_4\beta_7$  und  $\alpha_4\beta_1$ .

#### **3.3.2 Drastische Reduktion der IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria von MAdCAM-1 $\Delta/\Delta$ Mutanten**

Plasmazellen repräsentieren das letzte Stadium der B-Zell-Differenzierung und fungieren als AK-Produzenten. Nach Antigen-Stimulierung wandern naive B-Zellen entweder in die Medulla der Lymphknoten, wo sie proliferieren und zu kurzlebigen IgM-Plasmazellen differenzieren oder sie migrieren zu den B-Zell-Follikeln, wo der Isotypenwechsel stattfindet, der zur Differenzierung von langlebigen IgA- und IgG Plasmazellen führt [167]. Daher gibt es zwei Typen von Plasmazellen, die kurzlebigen, die meistens bereits *in situ* sterben und die langlebigen, die zu verschiedenen Organen, wie dem Knochenmark oder dem gastrointestinalen Trakt migrieren können. IgG-Plasmazellen migrieren vorzugsweise in das Knochenmark wohingegen IgA-Plasmazellen in die Lamina Propria des gastrointestinalen Trakts, sowie in die respiratorischen und urogenitalen Gewebe wandern [65] [168]. Wie gezeigt werden konnte, ist die Lokalisierung von IgA-Plasmazellen in der intestinalen Lamina Propria u.a. von der Expression des  $\alpha_4\beta_7$ -Integrins auf Plasmazellen abhängig [35]. Des Weiteren ist die Interaktion von CCR9, welches von IgA-Plasmazellen exprimiert wird, und seinem epithelial exprimierten Liganden CCL25 von Bedeutung für die Lokalisierung der IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria [73].

Die eingangs aufgestellte Vermutung, dass für die Verteilung der IgA-Plasmazellen die Expression von MAdCAM-1 ebenso von entscheidender Bedeutung ist, konnte anhand der von uns gewonnenen Daten erstmals nachgewiesen werden. Dieser Phänotyp konnte sowohl durch qualitative als auch durch quantitative Analysen bestätigt werden. MAdCAM-1 defiziente Mäuse weisen, genau wie  $\beta_7$ -Integrin defiziente Mäuse, im Vergleich zu C57BL/6-Wildtyptieren eine signifikante Reduktion in der Anzahl IgA<sup>+</sup>-Plasmazellen in der Lamina Propria auf (siehe Ergebnisse Abb. 2.17 und 2.18). Wir konnten zeigen, dass die Anzahl der IgA-Plasmazellen bei MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutanten im Vergleich zum WT auf ca. 20 % reduziert ist (siehe Ergebnisse Abb. 2.18). Mit diesem beobachteten Phänotyp wird deutlich, dass für die Lokalisierung der IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria des Darms die Interaktion von MAdCAM-1 mit  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin von entscheidender Bedeutung ist. Da die Expression von CCR9 runterreguliert wird, sobald Plasmazellen aus den PPs und MLNs in der Lamina Propria des Darms angekommen

sind [74], scheint die Interaktion von MAdCAM-1 /  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin für die Lokalisierung der Plasmazellen dominant zu sein.

#### **3.3.3 Die humorale IgA-Immunantwort ist abhängig von MAdCAM-1 / $\beta_7$ -Integrin Interaktionen**

Plasmazellen der Lamina Propria sezernieren dimeres IgA, das mit Hilfe von Transcytose in das Darmlumen abgegeben wird und an den Mucus oberhalb des intestinalen Epithels gebunden wird. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die selektive Lokalisierung von IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria des Darms von MAdCAM-1 -  $\beta_7$ -Integrin Interaktionen abhängig ist, wurde untersucht, ob das Fehlen dieser Adhäsionsmoleküle mit einer veränderten humoralen Immunantwort einhergeht. Für diesen Zweck wurden Immunisierungsexperimente durchgeführt, in denen sowohl MAdCAM-1 als auch  $\beta_7$ -Integrin defizienten Mutanten bzw. WT-Tieren oral und subkutan Cholera toxin verabreicht wurde. Mittels ELISA erfolgte dann der Nachweis von CT-spezifischem IgA bzw. IgG (siehe Ergebnisse Abb. 2.21). Hierbei stellte sich heraus, dass sowohl MAdCAM-1 als auch  $\beta_7$ -Integrin defiziente Tiere im Vergleich zu C57BL/6-Wildtypen keinen Unterschied im CT-spezifischen IgG-Titer im Blut zeigen. Beide Mausmutanten sind in der Lage sowohl nach oraler wie subkutaner Immunisierung eine reguläre IgG-spezifische Immunantwort auszulösen. Die Ursache hierfür liegt im Migrationsverhalten von IgG-Plasmazellen, die nach ihrer Differenzierung in den LN hauptsächlich ins Knochenmark wandern und daher auf die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin angewiesen sind [167]. Des Weiteren exprimieren IgG-Plasmazellen im Gegensatz zu IgA-Plasmazellen den Chemokin-Rezeptor CXCR3, der es ihnen zusätzlich ermöglicht in entzündete nicht-intestinale Gewebe einzuwandern [167]. Da IgG-Plasmazellen, wie schon erwähnt wurde, nicht in die Lamina Propria des Darms migrieren, war der Nachweis von CT-spezifischem IgG im Fäzes der Tiere nach oraler wie subkutaner Immunisierung nicht möglich (Daten nicht gezeigt). 2004 konnte in einer Studie von Hieshima und Kollegen, in der die Rolle der Chemokine CCL25 und CCL28 beim *homing* von IgA-Plasmazellen in die intestinalen Gewebe untersucht wurde, gezeigt werden, dass die Adhäsion von IgA-Plasmazellen an immobilisiertes MAdCAM-1 durch die Chemokine CCL25 und CCL28 induziert werden kann. Die Autoren konnten zeigen, dass beide Chemokine essentiell für das *homing* von IgA-Plasmazellen sind und stellten außerdem die Vermutung auf, dass IgA-Plasmazellen die Interaktion von MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin benötigen [72]. Die Annahme, dass das *homing* der IgA-Plasmazellen die Interaktion der untersuchten *homing*-Rezeptoren benötigt, kann durch die von uns gewonnenen Daten verstärkt werden. Wir konnten zeigen, dass im Gegensatz zu C57BL/6-Wildtypen sowohl MAdCAM-1 als auch  $\beta_7$ -Integrin defiziente Tiere nicht in der Lage sind nach oraler

Immunisierung eine reguläre IgA-Immunantwort auszulösen, was sich in einem deutlich verringerten IgA-Titer im Fäzes der Tiere zeigt. Daher kann aus diesen Daten geschlussfolgert werden, dass eine verringerte Anzahl von IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria des Darms (siehe Punkt 3.3.2) mit einer beeinträchtigten spezifischen IgA-Immunantwort nach oraler Immunisierung korreliert, was wiederum die Vermutung zulässt, dass das *homing* von IgA-Plasmazellen von der spezifischen Interaktion von MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin abhängig ist.

#### **3.3.4 Die Migration von Lymphozyten in MLNs ist abhängig von MAdCAM-1 / $\beta_7$ -Integrin Interaktionen**

Für die Analyse des Migrationsverhaltens von T-Lymphozyten in MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutanten wurden *in vivo* Migrationsassays durchgeführt. Durch die Injektion von WT- und  $\beta_7$ -Integrin defiziente Lymphozyten in MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutanten und C57BL/6-WT Rezipienten wurde analysiert, welchen Einfluss die Wechselwirkung von MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin auf die Migration von T-Zellen in Milz, PLN und MLN hat. Kein Unterschied im Migrationsverhalten von  $\beta_7$ -Integrin defizienten Lymphozyten im Vergleich zu WT-Lymphozyten konnte in MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutanten beobachtet werden. In WT-Tieren jedoch konnte festgestellt werden, dass  $\beta_7$ -Integrin defiziente Lymphozyten nicht in der Lage sind effizient in die MLNs zu migrieren (siehe Ergebnisse Abb. 2.19). Zwar sind die Lymphozyten aufgrund der Interaktion zwischen L-Selektin und MAdCAM-1 auf den HEVs noch in der Lage am Endothel entlang zu rollen und eine schwache Bindung herzustellen, sind aber aufgrund der nicht-stattfindenden Interaktion zwischen MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin nicht fähig fest zu adhären und in das lymphatische Gewebe des MLN einzuwandern. Diese Daten zeigen deutlich, dass für eine effiziente Rekrutierung von Lymphozyten in MLN die Wechselwirkung der Interaktionspartner MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin notwendig ist.

Erwartungsgemäß konnte für die Migration von T-Lymphozyten in Milz und PLN keine Abhängigkeit von MAdCAM-1 -  $\beta_7$ -Integrin-Interaktionen nachgewiesen werden. Da MAdCAM-1 nicht auf den HEVs der PLN exprimiert wird, dominieren in diesem lymphatischen Organ die Wechselwirkungen anderer Interaktionspartner. Die effiziente Migration von Lymphozyten in PLN wird hauptsächlich vermittelt durch Interaktionen von L-Selektin und PNAd [169] sowie durch LFA-1 und seinem Liganden ICAM-1 [29].

Die Migration von T-Zellen in die Milz gestaltet sich aufgrund der hier fehlenden postkapillaren Venolen anders als in Lymphknoten oder PPs. Zwar wurde aufgrund der Expression von MAdCAM-1 im marginalen Sinus der Milz vorerst angenommen, dass auch hier der Eintritt von Lymphozyten durch MAdCAM-1-vermittelte Interaktionen

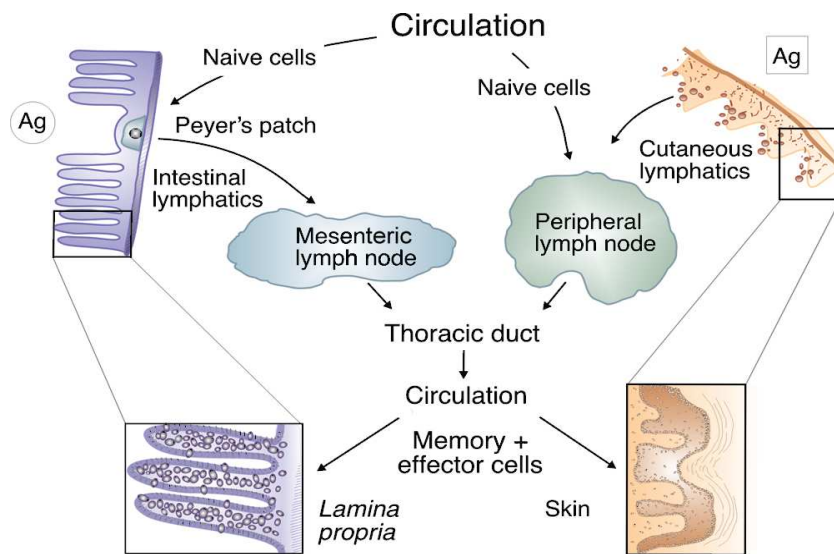


gesteuert wird [170], doch konnte diese Annahme bis jetzt nicht belegt werden. In einer Studie von 2003, in der blockierende AK verwendet wurden, konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Rekrutierung von T-Lymphozyten in die Milz nicht die Expression von L-Selektin oder  $\alpha_4$ -Integrinen auf den Lymphozyten benötigt [171]. Aufgrund dessen kann die Vermutung aufgestellt werden, dass eine Beteiligung von MAdCAM-1 beim *homing* von Lymphozyten in die Milz keine Rolle spielt.

#### **3.3.5 Das *homing* von immunkompetenten T-Effektorzellen in die Lamina Propria des Dünndarms ist abhängig von MAdCAM-1 Wechselwirkungen**

Die Antigen-abhängige Differenzierung von naiven T-Zellen in lymphatischen Organen führt zur Generierung von T-Effektorzellen, die in der Lage sind nicht-lymphatische Gewebe zu infiltrieren. T-Lymphozyten, die in den MLNs des Darms aktiviert wurden, exprimieren das Integrin  $\alpha_4\beta_7$  und den Chemokin-Rezeptor CCR9, die beide wichtig für die anschließende Lokalisierung der Effektorzellen im Dünndarm sind [56] [62]. Um nun die Migration von T-Effektorzellen in die Effektorkompartimente des GALT (siehe Abb. 3.1) zu untersuchen, wurden Immunisierungen mit einem Modellantigen durchgeführt, da erst mit der Aktivierung durch ein Antigen die Wanderung in das intraepitheliale bzw. Lamina Propria Kompartiment ermöglicht wird. Als Modellantigen diente in diesem Experiment OVA, das zur Verstärkung der Immunantwort gemeinsam mit LPS verabreicht wurde, um die Generierung von  $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup>-Lymphozyten zu erzielen. Um nun die Migration dieser  $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup>-T-Zellen nach Antigenverabreichung in Abhängigkeit von MAdCAM-1 zu untersuchen, wurden TCR-transgene OVA-spezifische OT1- und OT-2 Zellen in MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$ - und WT-Rezipienten transferiert. Die absoluten Anzahlen der transferierten OT-1 bzw. OT-2 Zellen wurden drei Tage nach der Immunisierung in Milz, PLN, MLN sowie in den Effektorkompartimenten des GALT ermittelt (siehe Ergebnisse Abb. 2.20). Aus den Daten geht hervor, dass, obwohl das Fehlen von MAdCAM-1 keinen Einfluss auf die Antigen-spezifische Aktivierung und Proliferation von OT-1 bzw. OT-2 Zellen in Milz, MLN und PLN hat, OT-1 und OT-2 Zellen nicht effizient in die Effektorkompartimente des GALT (IEL und LPL) migrieren können. So ist die Induktion und Expansion von T-Effektorzellen in den MLNs der MAdCAM-1  $\Delta/\Delta$  Mutanten zwar immer noch möglich, doch kann aufgrund der gestörten Migration in die Effektorkompartimente keine effiziente Immunantwort ausgelöst werden. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass MAdCAM-1 als endothelialer Rezeptor von  $\beta_7$ -Integrin involviert ist in der selektiven Lokalisierung von  $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup>-Lymphozyten in den Effektorkompartimenten des GALT nach erfolgter Aktivierung dieser Zellen in den MLNs.





**Abb. 3.2: Rezirkulationsrouten von Lymphozyten.**

Die Antigenaufnahme (Ag) in Darm und Haut erfolgt durch das Epithel und durch afferente Lymphbahnen. Lymphozyten wandern in organisierte lymphatische Organe (LN und PPs) aus dem zirkulierenden Blut ein und treten in Kontakt mit den postkapillaren HEVs. Schließlich treten sie in das darunterliegende Gewebe, um auf ihr entsprechendes Antigen zu treffen. Aktivierte Zellen verlassen die lymphatischen Gewebe durch efferente Lymphbahnen zurück in das zirkulierende Blut. (nach Salmi [173])

#### 3.3.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigten Auswirkungen der Deletion von MAdCAM-1 bei der Migration von T- und B-Lymphozyten sowie bei humoraler Immunantwort sollen durch weiterführende Experimente unterstützt und verifiziert werden.

Unsere gezeigten Daten weisen stark darauf hin, dass die selektive Migration von IgA-Plasmazellen in die intestinalen Gewebe der Lamina Propria die Interaktion von MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin benötigt. Bisher konnten wir zeigen, dass die Lokalisierung sowie die quantitative Verteilung der IgA-Plasmazellen in der Lamina Propria von der Wechselwirkung der analysierten Adhäsionsmoleküle abhängt. Mit Hilfe von `short-term` Migrationsassays, in denen die Wanderung von Antigen-spezifischen Plasmazellen untersucht wird, soll herausgefunden werden, ob die Expression von MAdCAM-1 auf die Migration von Plasmazellen in verschiedene lymphatische Organe einen Einfluss hat. Würde durch diese Experimente nachgewiesen werden, dass die Migration von Antigen-spezifischen Plasmazellen sowohl in die induktiven Kompartimente als auch in die Effektor-kompartimente des GALT in MAdCAM-1 defizienten Mausmutanten gestört ist, wäre der Beweis geliefert, dass für das *homing* von Plasmazellen die Interaktion von MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin benötigt wird. Parallel dazu könnte durch

immunhistochemische Analysen die Verteilung von Antigen-spezifischen Plasmazellen in den MLNs als induktivem Kompartiment untersucht werden.

Weiterhin wäre es sinnvoll die basalen Konzentrationen der Immunglobuline IgA und IgG im Serum und im Fäzes der MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin defizienten Mausmutanten mittels ELISA zu bestimmen. Da wir zeigen konnten, dass nach Antigen-Stimulierung der Titer von CT-spezifischem IgA im Darm der analysierten Mausmutanten verringert ist, wäre es interessant herauszufinden, ob durch das Fehlen von MAdCAM-1 bzw.  $\beta_7$ -Integrin *per se* eine geringere Konzentration von IgA im Fäzes der Mutanten vorliegt.

In zahlreichen Studien wurde sowohl die Rolle von MAdCAM-1 als auch von  $\beta_7$ -Integrin in verschiedenen experimentellen Kolitis-Modellen untersucht. Dabei konnte für beide Adhäsionsmoleküle eine Beteiligung bei der Pathogenese der entzündlichen Erkrankung des Darms beschrieben werden. Im Jahr 2000 konnte von Kato und Kollegen gezeigt werden, dass eine durch DSS in Mäusen bereits etablierte Kolitis durch die Gabe von anti-MAdCAM-1 AK abgeschwächt werden kann [88]. In einer weiteren Studie von 2006 wurde der Effekt von Probiotika auf die durch DSS verursachte Entzündung des Colons bei Mäusen untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die Verabreichung der probiotischen Substanz DHNA von *Propionibacterium freudenreichii* sowohl einen mildernden Effekt auf die durch DSS ausgelöste Entzündung im Colon der Tiere als auch auf die Unterdrückung der infiltrierenden Lymphozyten durch die Reduktion der endothelialen MAdCAM-1 Expression hat [172]. Die von Farkas und Kollegen kürzlich veröffentlichte Studie, in der bei chronischer Kolitis eine Hochregulierung der MAdCAM-1 Expression beobachtet wurde [87], untermauert die Beteiligung von MAdCAM-1 bei experimentell ausgelöster Kolitis. Auch für das  $\beta_7$ -Integrin konnte in einer aktuell veröffentlichten Studie die Beteiligung bei experimentell ausgelöster CED beschrieben werden [174].

Durch die Auslösung einer experimentellen Kolitis in der vorgestellten MAdCAM-1 defizienten Mausmutante könnte die Beteiligung des Adhäsionsmoleküls bei CED bewiesen werden. Im Vergleich zu WT-Tieren müsste sowohl in der MAdCAM-1 als auch  $\beta_7$ -Integrin  $\Delta/\Delta$  Mutante ein wesentlich milderer Verlauf der Kolitis zu verzeichnen sein. In Anbetracht der selektiven Rolle von MAdCAM-1 in entzündlichen intestinalen Erkrankungen könnten dann neue therapeutische Strategien entwickelt werden, die eine gezielte Blockade dieses Adhäsionsmoleküls beinhalten und so in der Behandlung von CED beim Menschen eingesetzt werden könnten.

## 4 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Herstellung und Analyse von konditionalen Mausmutanten zur Untersuchung der Interaktionen von  $\beta_7$ -Integrin und MAdCAM-1 bei lymphozytärer Migration und humoraler Immunantwort.

Um die Rolle der zytoplasmatischen Domäne des  $\beta_7$ -Integrins bei diesen Prozessen identifizieren zu können, sollten Mausmutanten mit spezifischen Mutationen erzeugt werden. Diese beinhalten zwei Deletionen, die entweder den kompletten Verlust der zytoplasmatischen Domäne ( $\Delta 61$ ) oder ein Entfernen der distalen Region ( $\Delta 34$ ) verursachen und zwei Punktmutationen in Bereichen, die vermutlich essentiell sind für die Signalweiterleitung ( $D_{736}$ -R und  $Y_{735}$ -A). Alle vier Mutationen konnten erfolgreich mittels gezieltem *gene targeting* in murinen embryonalen Stammzellen etabliert werden. Mit diesen Stammzellen konnte bisher für drei der Mutationen die Besiedelung der Keimbahn erreicht werden, was letztlich die Generierung homozygoter Mausmutanten und das *in vivo* Studium der veränderten  $\beta_7$ -Integrine ermöglichte. Es zeigte sich, dass die zytoplasmatische Domäne sowohl einen Einfluss auf die Oberflächenexpression von  $\beta_7$ -Integrin als auch auf die Heterodimerbildung mit  $\alpha_E$ -Integrin besitzt. Das Fehlen der distalen Region durch die Mutation  $\Delta 34$  und die Punktmutation D-R führen zum Verlust einer Subpopulation  $\beta_7$ -Integrin<sup>+</sup>-Lymphozyten und einer eingeschränkten Heterodimerbildung mit Expression des  $\alpha_E$ -Integrins. Die durch die  $\Delta 61$  Mutation bewirkte komplette Deletion der zytoplasmatischen Domäne führte zum vollständigen Verlust der  $\beta_7$ -Integrin Expression auf der Zelloberfläche. Weder die  $\Delta 34$  noch die D-R Mutanten weisen Veränderungen der Peyer'schen Platten auf, was darauf hindeutet, dass diese Bereiche der zytoplasmatischen Domäne nicht essentiell für die *homing*-Funktion von  $\beta_7$ -Integrinen in das GALT sind. Auswirkung der  $\Delta 61$  Mutation hingegen war eine reduzierte Anzahl von Peyer'schen Platten, was, vorausgesetzt, dass die korrekte Funktion des verbleibenden Integrinteils gewährleistet ist, auf eine generelle Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne bzw. des proximalen Anteils für die Migration hindeutet.

Die Analyse der MAdCAM-1 defizienten Mausmutante ergab, dass dieses Adhäsionsmolekül sowohl bei der Migration von Lymphozyten als auch bei der humoralen Immunantwort eine wichtige Rolle spielt. Wir konnten zeigen, dass bei MAdCAM-1 defizienten Mäusen die Lymphozyten nicht in der Lage sind, die Peyer'schen Platten des Darms effizient zu besiedeln. Wird kein MAdCAM-1 exprimiert kommt es zu einer signifikanten Reduktion der IgA-Plasmazellen in der intestinalen Lamina Propria. Unsere Immunisierungsexperimente zeigen außerdem, dass der Verlust von MAdCAM-1 mit einer verringerten spezifischen IgA-Immunantwort einhergeht. Diese Beobachtungen deuten

auf eine essentielle Rolle der spezifischen MAdCAM-1 und  $\beta_7$ -Integrin Interaktion für das *homing* von IgA-Plasmazellen hin. Weiterhin konnte durch unsere Analysen erstmals belegt werden, dass sowohl das *homing* von naiven als auch immunkompetenten T-Lymphozyten die von MAdCAM-1 vermittelten Wechselwirkungen benötigt. Wir haben gezeigt, dass die MAdCAM-1 -  $\beta_7$ -Integrin Interaktion entscheidend für die Migration von Lymphozyten in die induktiven Kompartimente sowie in die Effektorkompartimente des GALT ist. Ohne die Expression von MAdCAM-1 auf den HEVs des GALT sind Lymphozyten nicht in der Lage effizient die einzelnen Kompartimente zu besiedeln, um so die Aufrechterhaltung der mukosalen Immunität zu gewährleisten. Diese Funktion kann nicht durch VCAM-1, den anderen bekannten  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin Liganden kompensiert werden.

Zusammenfassend leisten die aus unseren Experimenten gewonnenen Erkenntnisse einen entscheidenden Beitrag zum komplexen Verständnis des *homings* von Lymphozyten in das darmassoziierte lymphatische Gewebe und bieten des Weiteren anhand der von uns generierten MAdCAM-1 defizienten Mausmutante einen Einstieg in die Aufklärung von Erkrankungen, die in ihrer Pathogenese die Infiltration von Lymphozyten benötigen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Chemikalien allgemein

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungen besaßen den Reinheitsgrad *pro analysis* und wurden bezogen von Amersham Biosciences, BioRad, Boehringer Ingelheim, Fluka, Höchst, Invitrogen, Merck, Millipore, Promega, Riedel de Haen, Roche, Roth und Sigma Aldrich. Alle Lösungen wurden mit hochreinem Wasser hergestellt (Milli-Q-System, Fa. Millipore).

### 5.2 Material für die Zellkultur

DMEM (GlutaMAX<sup>TM</sup>, Gibco), Fötales Kälberserum (FCS) (Gibco bzw. PAA), G418 (Sigma), Gelatine (Sigma), LIF (*leukemia inhibitory factor*) (eigene Produktion), 2-Mercaptoethanol (50 mM) (Gibco), Na-Pyruvat (100 mM) (Gibco), nicht-essentielle Aminosäuren (100x) (Gibco), PBS (1x) (Gibco), Penicillin/Streptomycin-Lösung (10 U/μl Penicillin und 10 μg/μl Streptomycin in 0,85 % Saline) (Gibco), Trypsin-EDTA (1x) (Gibco), DMSO (ICN).

Plastikware, wie sterile Kulturgefäße und Röhrchen wurden von Corning, Falcon und Nunc bezogen.

### 5.3 Verwendete Zelllinien

#### 5.3.1 Murine embryonale Feederzellen (EF-Zellen) mit Neomycinresistenz

Diese Zellen tragen das Neomycin-Resistenzgen und wurden aus IL10-Knockout und IL4-transgenen-Mäusen gewonnen [175] [176].

#### 5.3.2 Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen)

**IB10.1:** Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine hohe Keimbahntransmissionseffizienz aus und stammt aus 129SV-Mäusen. Wenn im C57/BL6-Hintegrund gearbeitet wird, sind Rückkreuzungen nötig.

**F1 IDG32:** Unveröffentlichte F1 Zelllinie (aus der F1-Generation 129SV x C57BL/6). Diese Zellen weisen im Gegensatz zu anderen embryonalen Stammzellen eine erhöhte Rekombinationseffizienz und eine erhöhte Keimbahngängigkeit auf (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ralf Kühn, GSF, München).

### 5.4 Medien für murine embryonale Stammzellen

#### 5.4.1 EF-Medium

500 ml DMEM (GlutaMAX<sup>TM</sup>, 4500 mg/l Glucose, Pyridoxin, ohne Na-Pyruvat), 60 ml FCS, 6 ml Na-Pyruvat, 6 ml Streptomycin/Penicillin.

#### 5.4.2 ES-Medium

500 ml DMEM (GlutaMAX<sup>TM</sup>, 4500 mg/l Glucose, Pyridoxin, ohne Na-Pyruvat), 75 ml FCS, 6 ml Na-Pyruvat, 6 ml Streptomycin/Penicillin, 6 ml nicht essentielle Aminosäuren, 600 µl LIF. Zur Selektion wird dem Medium 350 µg/ml G418 hinzugefügt.

#### 5.4.3 Einfriermedium (2x)

ES-Medium mit 20 % DMSO und 50 % FCS.

### 5.5 Methoden in der Zellkultur

#### 5.5.1 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen

DMSO verhindert durch seine hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen. Daher wurde für das Einfrieren von ES-Zellen Einfriermedium mit DMSO verwendet. Dafür wurden die Zellen abtrypsinisiert, mit ES-Medium aufgefüllt und für 5 min bei 200 x g pelletiert. Schließlich wurden die Zellen im entsprechenden Volumen ES-Medium resuspendiert, 1:1 mit Einfriermedium versetzt und bei -80 °C gelagert. Die in Kryoröhrchen eingefrorenen ES-Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in Röhrchen mit frischem Medium überführt und für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden dann im entsprechenden Volumen Medium resuspendiert und auf Kulturschalen ausgesät.

#### 5.5.2 Splitten und Expandieren von ES-Zellen

Sobald die ES-Zellen im subkonfluenten Stadium vorlagen, wurden diese passagiert, um eine mögliche Differenzierung zu vermeiden. Dafür wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, abtrypsinisiert, mit Medium aufgefüllt und in der gewünschten Verdünnung auf neue mit Feederzellen beschichtete Kulturschalen ausgesät. Die Gabe von frischem ES-Medium erfolgte täglich.

### 5.5.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Um die Zellzahl pro ml zu bestimmen, wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat ermittelt und diese Zahl mit  $10^4$  multipliziert. Eventuelle Verdünnungen vor der Zellzahlbestimmung wurden in der Berechnung berücksichtigt.

### 5.5.4 Stabile Transfektion von ES-Zellen mit den *Targeting* Vektoren

Am Tag der Transfektion mussten so viele Stammzellen im subkonfluenten Stadium vorliegen, dass ca. 10 Mio. Zellen für die Transfektion eingesetzt werden konnten.

Eine entsprechende Anzahl von Kulturschalen mit ES-Zellen wurden ausgewählt und die Zellen wurden nach dem Waschen mit 1x PBS mit Trypsin von der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt und bei 200 x g für 5 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert und die Zellen wurden in der Neubauer Zählkammer gezählt. Von der Zellsuspension wurden 10 Mio. Zellen abgenommen und diese wurden nochmals bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert und in 800 µl PBS aufgenommen. Die Zellen wurden mit der sterilen zuvor linearisierten DNA (~10 µg) gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 240 V und 475 µF im Gene Pulser von BioRad. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen auf Kulturschalen ausgesät, bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und erhielten täglich frisches Medium. Nach 48 h wurde die Selektion mit G418 begonnen. 8-10 Tage nach Selektionsstart waren die ES-Zellklone groß genug und konnten gepickt werden.

### 5.5.5 Isolierung von Klonen

Durch Selektion mit G418 überleben nur die Klone, die das *Targeting* Konstrukt in ihr Genom integriert haben. Pro Transfektion wurden 300-600 Klone gepickt. Für das Picken der Klone mussten die Zellkolonien groß genug sein und sollten außerdem klar erkennbare Grenzen aufweisen und nicht differenziert sein. Vor dem Picken wurde eine entsprechende Anzahl an 96-Loch-Platten (mit runden Böden) mit 50 µl Trypsin-EDTA je Loch vorbereitet. Die ES-Zellklone wurden in einem Volumen von 20 µl PBS gepickt und jeder Klon wurde in ein Loch mit Trypsin-EDTA überführt. Nach etwa 10 min wurde die Trypsinreaktion durch die Zugabe von 80 µl ES-Medium abgestoppt. Das Picken der Klone wurde auf diese Weise fortgeführt, bis keine Kolonien mehr auf den Platten zu finden waren. Nun wurde jeder gepickte Klon auf drei mit Feederzellen beschichtete 96-Loch-Platten (glatte Böden) aufgeteilt, so dass jedes Loch der 96-Loch-Platten 50 µl der



Zellsuspension erhielt. In allen Löchern der 96-Loch-Platten wurde vorher 100 µl ES-Medium vorgelegt, so dass ein Gesamtvolumen von 150 µl/Loch vorlag.

Alle Klone wurden bis zur Konfluenz im Brutschrank inkubiert und erhielten jeden Tag frisches Medium. Zwei der jeweils drei identischen Platten wurden, wie unter 5.5.6 beschrieben, für eventuelle spätere Expansion von Klonen bei –80 °C eingefroren. Die Klone der dritten 96-Loch-Platte wurden für die DNA-Gewinnung wiederum auf drei mit Gelatine (0,1 % (w/v) in PBS (1x) ) beschichtete 96-Loch-Platten aufgeteilt. Nachdem die Zellen auf diesen Platten sehr dicht gewachsen waren, wurde schließlich die Zelllyse und die DNA-Gewinnung durchgeführt.

### **5.5.6 Einfrieren von ES-Zellklonen in 96-Loch-Platten**

Nachdem die Klone in den 96-Loch-Platten dicht gewachsen waren, wurden diese direkt in den 96-Loch-Platten eingefroren. Dazu wurden die Zellen mit 50 µl Trypsin vom Plattenboden abgelöst. Nach ca. 3 min wurde die Trypsinreaktion durch die Zugabe von 50 µl ES-Medium abgestoppt und die Zellen wurden im Medium gut resuspendiert. Zu den resuspendierten Zellen wurden nun 100 µl Einfriermedium gegeben. Schließlich wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet und konnten so bei –80 °C eingefroren und gelagert werden.

### **5.5.7 Revitalisierung von ES-Zellklonen in 96-Loch-Platten**

Für die Revitalisierung von potentiell positiven Klonen wurden die bei –80 °C gelagerten 96-Loch-Platten rasch bei 37 °C aufgetaut. Die Replikaklone in den entsprechenden Löchern der 96-Loch-Platten wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt, mit Medium aufgefüllt und für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und die Zellen wurden in Medium resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen auf das mit EF-Zellen beschichtete Loch einer 48-Loch-Platte ausgesät. Es erfolgte die tägliche Gabe von frischem Medium und nach erfolgreicher Revitalisierung konnten die Zellen expandiert werden.

### **5.5.8 Transiente Transfektion von ES-Zellen mit dem FIp-Plasmid**

Die Transfektion des FIp-Plasmids (trägt Puromycin-Resistenzkassette) führt zur transienten Expression der FIp Rekombinase und der anschließenden FIp-vermittelten *in vitro* Deletion des mit FRT Sequenzen flankierten Neomycin-Resistenzgens. Wie bei einer stabilen Transfektion wurden 10 Mio. ES-Zellen für die Transfektion eingesetzt. Diese wurden zuvor bis zur Subkonfluenz kultiviert, abtrypsinisiert, gezählt und für die Transfektion in 800 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden mit der sterilen nicht-

linearisierten Plasmid-DNA (~ 30 µg) gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte wie unter 5.5.4 beschrieben bei 240 V und 475 µF. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurden die transfizierten ES-Zellen dann auf fünf mit EF-Zellen beschichtete Kulturschalen ausgesät (Dichte ca.  $2 \times 10^6$  Zellen / Platte). Nach 24 h wurde die Selektion mit Puromycin begonnen. Dabei wurden Puromycin-Konzentrationen von 1,5 – 2,5 µg/ml verwendet. Nach zwei Tagen Selektion wurden die ES-Zellen abtrypsinisiert und auf neue mit EF-Zellen beschichtete Kulturschalen replatiert (Dichte ca.  $1 \times 10^3$  Zellen / Platte). Übriggebliebene Puromycin-resistente Zellen konnten für ein späteres Replatieren eingefroren werden (siehe Punkt 5.5.1). Nachdem die ausgesäten ES-Zellen groß genug waren, konnten diese gepickt werden. Die gepickten Zellkolonien wurden wie bei einer stabilen Transfektion in eine 96-Loch-Platte mit 50 µl Trypsin / Loch überführt. Anschließend wurden die vereinzelter Zellen 1:2 auf zwei 48-Loch-Platten transferiert und mit ES-Medium kultiviert. Nach 2-3 Tagen erfolgte für eine der Replikaplaten die Kultivierung mit ES-Medium + G418. Dieser G418-Sensitivitätstest dient der Überprüfung der Neomycin-Deletion. G418-sensitive Klone von der zweiten Replikaplatte (kultiviert mit normalem ES-Medium) wurden für die Isolierung genomischer DNA und zum Einfrieren expandiert.

### **5.5.9 Zelllyse von ES-Zellklonen und anschließende DNA-Gewinnung**

Für die Zelllyse wurde jedes Loch mit Zellen vorerst zwei mal mit je 100 µl PBS gewaschen. Danach erhielt jedes Loch 50 µl Lysis-Puffer, der sich aus 45 µl Tail-Puffer (siehe Punkt 5.6.1) und 5 µl frisch zugesetzter Proteinase K (10 mg/ml, Sigma) zusammensetzt. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und für 4-12 h bei 54 °C schüttelnd inkubiert. Für die DNA-Gewinnung wurden die Platten zunächst für 1 h auf RT abgekühlt, bevor die Zugabe von 100 % EtOH (100 µl/Loch) zur DNA-Fällung erfolgte. Die Platten wurden für mindestens 1 h bei RT schüttelnd inkubiert, bis die präzipitierte DNA mit bloßem Auge am Plastikboden sichtbar wurde. Nachdem die DNA für 30 min bei 3220 x g pelletiert wurde, erfolgte ein Waschschriff mit 70 % EtOH (100 µl/Loch) bei 3220 x g für 15 min und schließlich die Resuspension der getrockneten DNA in 30 µl TE-Puffer (siehe Punkt 5.6.1) ü.N. bei 54 °C. Die so gewonnene genomische DNA konnte entweder sofort als PCR-Matrize eingesetzt werden oder für die Southern Blot Analyse mit dem entsprechenden Enzym gespalten werden. In einem 50 µl Ansatz wurden der DNA 50 U Enzym, 5 µl 5-fach konzentrierter Puffer, sowie 0,5 µl RNase I (10 mg/ml, DNase- und Protease-frei, MBI-Fermentas) zugesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 10 µl Auftragspuffer und die DNA konnte in einem Agarosegel aufgetrennt werden.

## 5.6 Molekularbiologische Standardmethoden

Die meisten der nachfolgend aufgeführten Protokolle wurden gemäß '*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*' [177] durchgeführt.

### 5.6.1 Verwendete Lösungen, Puffer und Medien

#### *Ampicillin-Stocklösung*

50 mg Ampicillin / ml wurden in MilliQ gelöst und anschließend sterilfiltriert.

#### *Church-Puffer*

40 ml 1 M NaHPO<sub>4</sub> (pH 6,8) und 50 ml 20 % (v/v) SDS wurden mit bidest. H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 1 Liter gebracht.

#### *LB-Agarplatten für E.coli*

15 g Agar wurden vor dem Autoklavieren zu 1 Liter LB-Medium hinzugegeben.

#### *LB-Vollmedium für E.coli*

Zu 950 ml bidest. H<sub>2</sub>O wurden 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt und 5 g NaCl gegeben. Nach Rühren wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Das Volumen wurde dann auf 1 Liter mit bidest. H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert.

#### *Lysis-Puffer (Tail-Puffer nach 'Laird')*

Der Puffer besteht aus 200 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 5 mM EDTA (pH 8,0) und 0,2%igem (w/v) SDS. 100 µg/ml Proteinase K wurden jeweils kurz vor Gebrauch frisch dazugegeben.

#### *Proteinase K Stocklösung*

10 mg Proteinase K wurden in 1 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7,4) gelöst.

#### *STE-Puffer (1x)*

Für den STE-Puffer wurden 0,1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 1 mM EDTA (pH 8,0) in bidest. H<sub>2</sub>O gelöst.

#### *TAE (50x)*

242 g Tris-Base, 57 ml 100 % (v/v) Essigsäure und 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) wurden auf einen Liter mit bidest. H<sub>2</sub>O aufgefüllt und gelöst.

#### *TE-Puffer, pH 7,4*

Der Puffer besteht aus 10 mM Tris/HCl (pH 7,4) und 1 mM EDTA (pH 8,0).

### 5.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Gewinnung von Plasmid-DNA erfolgte mit Isolierungssystemen der Fa. Macherey-Nagel (*Nucleo Spin Plasmid* und *Nucleobond AX 500*) nach Angaben des Herstellers.

### 5.6.3 Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen

Die Mausschwanzspitze wurde mit 720 µl Tail-Puffer und 30 µl Proteinase K (10 mg/ml, Sigma) für 4-12 h schüttelnd bei 54 °C verdaut. Zellreste und Haare wurden in einer Tischzentrifuge bei 11.000 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 600 µl Isopropanol überführt. Um die DNA zu präzipitieren wurden die Reaktionsgefäße geschüttelt und die DNA bei 11.000 x g für 5 min pelletiert und anschließend für 1 min bei 11.000 x g mit 500 µl 70%igem EtOH gewaschen. Schließlich wurde die DNA für einige min bei RT getrocknet und ü.N. bei 54 °C im entsprechenden Volumen TE-Puffer gelöst.

### 5.6.4 Agarosegelelektrophorese

Agarose ist ein Polysaccharid, das in 1%igen (w/v) TAE- oder TBA-Lösungen nach Aufkochen und Gelieren ein charakteristisches Netz mit Poren von etwa 150 nm Größe ausbildet. Aufgrund der negativen Gesamtladung der DNA wandert diese in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und wird nach Größe aufgetrennt.

Für die Auftrennung größerer DNA-Fragmente (z.B. die Auftrennung chromosomaler DNA für Southern Blot) wurden 0,8 – 1%ige Agarosegele angefertigt. Für kleinere Fragmente wurden entsprechend höherprozentige Gele angefertigt. Bevor das Gel geliert war, wurden ihm stets 1/3000 bis 1/4000 Volumen 1%iges 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid (Ethidiumbromid) zugesetzt, um die DNA nach Auftrennung unter UV-Licht sichtbar zu machen. Beim Auftrennen der DNA wurde stets ein Längenstandard (1 kb Leiter oder *low range* Leiter von Peqlab) mit genau definierten Fragmentgrößen aufgetragen. Außerdem wurde die DNA vor dem Auftragen in die Geltaschen stets mit 1/6 Volumen Ladepuffer versehen.

### 5.6.5 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel

Die Aufreinigung von DNA, wie einzelnen Fragmenten oder PCR-Amplifikaten, erfolgte mit dem *Nucleo Spin Extract Kit* von Macherey-Nagel bzw. dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen. Die aufzureinigende DNA wurde hierfür aus dem Agarosegel mit einem Skalpell herausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 5.6.6 Restriktionsspaltungen

Die Restriktionsspaltung von Plasmiden, genomischer DNA aus ES-Zellen oder Mausschwanzspitzen, sowie die Linearisierung von *Targeting* Vektoren vor einer Transfektion erfolgte mit Restriktionsendonukleasen und den entsprechenden Puffern nach Angaben der Hersteller. Es wurden Restriktionsendonukleasen von MBI Fermentas, sowie New England Biolabs eingesetzt.

### 5.6.7 Ligation und Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4 DNA-Ligase von New England Biolabs nach Angaben des Herstellers. Zur Subklonierung von DNA-Fragmenten wurden Klonierungssysteme von Promega (pGEM<sup>®</sup>TEasy) und Invitrogen (pCR4-TOPO<sup>®</sup>-Vektor) verwendet.

### 5.6.8 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

Bei der Transformation handelt es sich um das Einbringen von Fremd-DNA in Bakterien. Es wurde Plasmid-DNA in die bereits kompetenten *Escherichia coli* Bakterien DH5 $\alpha$  (Genotyp: F<sup>-</sup>,  $\Phi$ dlacZ  $\alpha$  M15, endA1, recA1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>-</sup>), supE44, thi-1, gyrA96, relA1,  $\Delta$  (lacZYA-argF)U169,  $\lambda$ <sup>-</sup>) eingebracht.

### 5.6.9 Isolierung von DNA-Sonden

Die Sonde zum Nachweis der homologen Rekombination der *Targeting* Vektoren in den genomischen  $\beta_7$ -Integrin Locus der Maus wurde aus dem Plasmid pBsKs18H (siehe Anhang) isoliert. Entweder wurde die Sonde durch Restriktionsspaltung direkt aus diesem Plasmid isoliert und aufgereinigt (2,2 kb Sonde) oder ein PCR-Fragment aus pBsKs18H wurde vorher in den TA Klonierungsvektor pCR4-TOPO kloniert und aus diesem isoliert und aufgereinigt (1 kb Sonde). Die eingesetzten Sonden hybridisieren stromabwärts außerhalb der *Targeting* Vektor Sequenz, um die korrekte Integration des *Targeting* Konstrukts nachweisen zu können.

### 5.6.10 Southern Blot und Hybridisierung

Der Southern Blot diente in dieser Arbeit sowohl der Detektion von homolog rekombinierten ES-Zellklonen, als auch der Genotypisierung von Mäusen.

Zur weiteren Untersuchung der durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennten DNA wurde diese auf eine feste Membran transferiert. Das Blotten erfolgte mittels eines alkalischen Kapillarblots. Geblottet wurde auf Nylonmembranen von Amersham Pharmacia (Nylon Membran Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech). Nach dem Blotten wurde die Membran für 1 h bei 80 °C gebacken, um die DNA darauf zu fixieren.

Die fixierte DNA konnte dann durch Hybridisierung identifiziert werden. Vor der Hybridisierung wurde die getrocknete Membran für ca. 1 h bei 65 °C schwenkend im Wasserbad in Church-Puffer gewaschen. Dann erfolgte die Prähybridisierung der Membran für mind. 1 h in ca. 10 ml QuickHyb®-Hybridisierungslösung (Stratagene) bei 65°C in einer Hybridisierungsröhre. Anschließend fand die Hybridisierung ü.N. bei 65°C statt. Dazu wurde die denaturierte Sonde mit 1 ml der Prähybridisierungslösung gemischt und zu der bereits vorhandenen Hybridisierungslösung gegeben. Nach der Hybridisierung wurde die Membran in Church-Puffer 2-3 mal bei 65 °C schwenkend im Wasserbad gewaschen. Schließlich wurde die Membran feucht in Folie eingeschweißt. Die Membran wurde mit einem Röntgenfilm in eine Filmkassette (bzw. eine Phosphorimagerkassette) gelegt und die Exposition erfolgte für mindestens 24 h bei –70°C. Das markierte Hybrid wurde schließlich durch Autoradiographie identifiziert.

### 5.6.11 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung von DNA-Sonden erfolgte mit Hilfe des *Ladderman™ Labeling Kit* von Takara und dem Isotop  $\alpha^{32}\text{P}[\text{dCTP}]$ . Für die Markierung wurden ca. 50-100 ng DNA eingesetzt. Für die Aufreinigung der markierten Sonde wurden *ProbeQuant™ G-50 Micro* Säulen von Amersham Pharmacia Biotech verwendet.

### 5.6.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurde die PCR für verschiedene Anwendungen eingesetzt. Zum einen zum Screenen von ES-Zellklonen und für die Genotypisierung von Mäusen und zum anderen zur Erzeugung von DNA-Fragmenten für die Klonierung.

Die Primer für die PCR wurden ausgehend von Sequenzdaten entworfen und von Biosprings bezogen. Als Polymerase wurde Taq Gold Polymerase von Roche eingesetzt. PCR-Reaktionen wurden i.d.R. in einem Volumen von 25 µl angesetzt: X µl DNA; 2,5 µl 10x Puffer, 0,5-0,75 µl 10 mM dNTPs, 2 µl 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5-1 µl *sense*Primer (10 pmol/µl), 0,5-1 µl *antisense*Primer (10 pmol/µl), 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl), X µl MilliQ  $\text{H}_2\text{O}$ .

Die einzelnen PCR-Programme wurden individuell ausgehend von den Schmelztemperaturen der Primer, erwarteter Größe des Amplifikats, sowie Art der eingesetzten DNA gewählt. Die Sequenzen aller nachfolgend genannten Primer (versehen mit Nummern) befinden sich im Anhang.

### 5.6.12.1 PCR zum Screenen der ES-Zellklone

Um ein schnelleres Screenen von ES-Zellklonen zu ermöglichen wurde eine PCR-Strategie entwickelt. Diese PCR basiert auf dem *sense*-Primer (Neo2sense<sup>1</sup>), welcher sich im Neomycin-Resistenzgen befindet und dem *antisense*-Primer (Psgantisense<sup>2</sup>) der sich im genomischen Locus außerhalb des *Targeting* Konstrukts befindet. Bei homologer Rekombination wird ein Produkt von 1,5 kb Größe amplifiziert.

### 5.6.12.2 PCR zum Nachweis der Deletion des Neomycin-Resistenzgens

Diese PCR dient sowohl dem Nachweis der Deletion des Neomycin-Resistenzgens in ES-Zellen als auch für Mausgenotypisierungen. Die PCR basiert auf der Amplifizierung der im Genom verbliebenen Rekombinationssequenz. Bezeichnungen der verwendeten Primer: NeoDelsense<sup>3</sup> und NeoDelantisense<sup>4</sup>. Die verbliebene Rekombinationssequenz vergrößert das WT-Amplifikat von 116 bp auf 185 bp.

### 5.6.12.3 PCR zur Genotypisierung der $\Delta 61$ -Mäuse

Die PCR zur Genotypisierung der  $\Delta 61$ -Mäuse basiert auf zwei Primern, die das inserierte SV40 poly(A) Signal amplifizieren. Bezeichnungen der verwendeten Primer: Agelsense<sup>5</sup> und AatIIantisense<sup>6</sup>. Für das WT-Allel wurde ein Fragment von 650 bp amplifiziert; das eingeführte poly(A) Signal vergrößert das Fragment auf 870 bp.

### 5.6.12.4 PCR zur Amplifizierung von Exon 15 des $\beta_7$ -Integrin Gens

Für die Amplifizierung des Exons 15 aus dem  $\beta_7$ -Integrin Gen dienten die Primer Ex15sense<sup>7</sup> und Ex15antisense<sup>8</sup>.

### 5.6.12.5 PCR zur Amplifizierung der Southern-Sonde aus pBsKs18H

Zur Amplifizierung der 1 kb großen Sonde aus pBsKs18H dienten die Primer 18Hsense<sup>9</sup> und 18Hantisense<sup>10</sup>.

### 5.6.12.6 PCR zur Einführung von Schnittstellen in den Targeting Vektor $\Delta 61$

Für die Einführung der Schnittstellen *NdeI* und *AflII* in den *Targeting* Vektor  $\Delta 61$  wurden zwei PCRs mit den Primern Agelsense<sup>11</sup>, *NdeI*/*AflII*antisense<sup>12</sup>, *AflII*/*NdeI*sense<sup>13</sup> sowie AatIIantisense<sup>14</sup> durchgeführt.

### 5.6.12.7 PCR zur Amplifizierung des SV40 poly(A) Signals aus pGL3-Promotor

Zur Amplifizierung des SV40 poly(A) Signals aus dem Vektor pGL3-Promotor (Promega) dienten die Primer Poly(A)*NdeI*sense<sup>15</sup> und Poly(A)*AflII*antisense<sup>16</sup>.



### 5.6.13 Umklonierung des *Targeting* Vektors $\Delta 61$

Unter Klonierung versteht man das künstliche Zusammenfügen von DNA-Fragmenten. Dazu wird das zu klonierende DNA-Fragment mit Restriktionsendonukleasen gespalten und mit einer Ligase in einen Vektor eingefügt. Als Klonierungsvektoren wurden in dieser Arbeit pGEM®TEasy (Promega) und pCR4-TOPO® (Invitrogen) verwendet.

Die Klonierungen in dieser Arbeit dienten dem Einfügen des SV40 *late* poly(A) Signals aus dem Plasmid pGL3 Promotor (Promega) in den *Targeting* Vektor  $\Delta 61$ .

### 5.7 Isolierung von primären murinen Zellen

In dieser Arbeit wurden Zellen aus Blut, Milz und Lymphknoten, sowie spezielle Lymphozyten aus dem Darm, für verschiedene Anwendungen, wie für FACS-Analysen und Elispot-Analysen isoliert. Dabei wurden, soweit nicht anders erwähnt, alle Zentrifugationsschritte bei 4 °C und alle Arbeiten auf Eis durchgeführt.

#### 5.7.1 Verwendete Mauslinien

Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien ist in Tab. 5.1 gegeben. Alle für diese Arbeit durchgeführten Tierversuche geschahen vorschriftsgemäß unter Einhaltung des deutschen Rechts für Tierschutz und wurden zugelassen vom „Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit“.

Bezeichnung	Abkürzung	Bemerkungen	Literaturverweis
C57BL/6	B6	Wildtyp	
$\beta_7$ -Integrin Knockout	$\beta_7$ -KO	$\beta_7$ -Integrin komplett Knockout (Hintergrund: C57BL/6)	[35]
MAdCAM-1 Knockout	MAdCAM-1 KO	MAdCAM-1 komplett Knockout (Hintergrund: C57BL/6)	
$\beta_7$ -Integrin $\Delta 34$ B11	$\Delta 34$ B11	Deletion der 34 C-terminalen AS der zytoplasmatischen Domäne des $\beta_7$ -Integrins (Hintergrund: gemischt, mit Neo)	
$\beta_7$ -Integrin $\Delta 34$ B11 x Flp-Deleter	$\Delta 34$ B11 x flp	Deletion der 34 C-terminalen AS der zytoplasmatischen Domäne des $\beta_7$ -Integrins (Hintergrund: gemischt, ohne Neo)	
$\beta_7$ -Integrin $\Delta 34$ G5 x Flp-Deleter	$\Delta 34$ G5 x flp	Deletion der 34 C-terminalen AS der zytoplasmatischen Domäne des $\beta_7$ -Integrins (Hintergrund: gemischt, ohne Neo)	
$\beta_7$ -Integrin D-R C5 x Flp-Deleter	D-R C5 x flp	D <sub>753</sub> -R Mutation in der zytoplasmatischen Domäne des $\beta_7$ -Integrins (Hintergrund: gemischt, ohne Neo)	
$\beta_7$ -Integrin $\Delta 61$ D1 flp	$\Delta 61$ D1 flp	komplette Deletion der zytoplasmatischen Domäne des $\beta_7$ -Integrins (Hintergrund: gemischt, ohne Neo)	
$\beta_7$ -Integrin $\Delta 61$ D5 flp	$\Delta 61$ D5 flp	komplette Deletion der zytoplasmatischen Domäne des $\beta_7$ -Integrins (Hintergrund: gemischt, ohne Neo)	

**Tab. 5.1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien.** Die Zucht aller aufgeführten Mauslinien erfolgte in der Tierexperimentellen Einheit des HZI.

### 5.7.2 Verwendete Lösungen, Puffer und Medien

**HBSS-FCS-DNase-Collagenase-Medium:** HBSS (Gibco), 10 % FCS (Gibco bzw. PAA, hitzinaktiviert für 30 min bei 56 °C), 50 U/ml DNase I (Roche), 100 U/ml Collagenase A (Roche, von *Clostridium histolyticum*)

**HBSS-FCS-EDTA-Medium:** HBSS (Gibco), 10 % FCS (Gibco, bzw. PAA), 2 mM EDTA

**Lysepuffer:** BD Pharm Lyse™ von Becton Dickinson für die Erythrozytenlyse. Der Puffer wird direkt vor Gebrauch 1:10 mit MilliQ verdünnt.

*PBS/0,5% BSA (w/v)*: für einen Liter werden 5 g BSA in 1x PBS gelöst. Die Lösung wird anschließend sterilfiltriert.

*PBS/10% FCS (v/v)*: 1x PBS (Gibco), 10 % hitzeinaktiviertes FCS (Gibco, bzw. PAA)

*PBS/0,05 % Tween 20 (v/v)*: 1x PBS (Gibco), 0,05 % Tween 20

*Percoll-Lösungen*: 70%ige Percoll-Lösung setzt sich zusammen aus 70 % Percoll® (Sigma), 10 % 10x PBS, 20 % MilliQ; 40%ige Percoll-Lösung setzt sich zusammen aus 40% Percoll® (Sigma), 10 % 10x PBS, 50 % MilliQ

*RPMI-Medium*: RPMI 1640 1x (Gibco, 2mM L-Glutamin), 10 % FCS (Gibco bzw. PAA), 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco)

### 5.7.3 Isolierung von Milzzellen

Die Maus wurde durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet und die Milz wurde entfernt und in eine Petrischale mit PBS/0,5% BSA überführt. Mit Hilfe eines Zellsiebes (Porengröße 100 µm) und dem Stempel einer 1 ml Spritze wurde die Milz homogenisiert. Nachdem die Zellsuspension in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und das Sieb gut gespült wurde (Suspension in einem Röhrchen vereinigen), erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 290 x g. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 3 ml Lysepuffer aufgenommen, gut resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit PBS/0,5% BSA aufgefüllt, für 5 min bei 290 x g zentrifugiert und das Zellsediment schließlich in 5 ml PBS/0,5% BSA resuspendiert. Für die Zellzahlbestimmung wurde eine 1:50 Verdünnung hergestellt und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ermittelt.

### 5.7.4 Isolierung von Lymphozyten aus Blut für die FACS-Analyse

Für die Isolierung von Lymphozyten aus Blut wurde der Maus entweder direkt aus dem Herzen oder retrobulbär (durch ausgebildete Tierpfleger) Blut entnommen. Das Blut (ca. 50 µl) wurde sofort zur Gerinnungshemmung mit ca. 20 µl Heparin (Ratiopharm) gemischt und auf Eis gelagert. Das gekühlte Blut wurde mit 1 ml Lysepuffer versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 900 x g wurde das Zellsediment mit 1 ml PBS/0,5% BSA gewaschen und erneut zentrifugiert (s.o.). Die Zellen wurden dann in 100 µl PBS/0,5% BSA resuspendiert und in das Loch einer 96-Loch-Platte (runder Boden) überführt. Durch eine Zentrifugation für 5 min bei 250 x g wurden die Zellen pelletiert und in 100 µl Färbemix (enthält die fluoreszenzmarkierten

Antikörper für die Färbung) resuspendiert. Die Inkubation der Zellen mit den markierten Antikörpern erfolgte dunkel und auf Eis für 15 min. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 250 x g wurden die Zellen mit 150 µl PBS/0,5% BSA gewaschen und erneut zentrifugiert (s.o.). Schließlich wurden die Zellen in 100 µl PBS/0,5% BSA resuspendiert, in FACS-Röhrchen mit 200 µl PBS/0,5% BSA überführt und konnten am FACS-Gerät analysiert werden.

### **5.7.5 Entnahme von Blut für die Gewinnung von Serum**

Die Entnahme des Bluts erfolgte wie unter 5.7.4 beschrieben aus dem Herzmuskel der Maus. Für die Gewinnung von Serum wurde das geronnene Blut zweimal für 8 min bei 600 x g in einer Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Serum wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und konnte so bei -20 °C gelagert werden.

### **5.7.6 Aufarbeitung von Fäzes**

Der durch Spülen des Dünndarms mit einer 1 ml Spritze gesammelte Fäzes wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß, in dem als Protease-Inhibitor 10 µl PMSF vorgelegt wurden, gesammelt. Durch eine Zentrifugation bei 11.000 x g in einer Tischzentrifuge bei 4 °C wurde der Kot entfernt und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der gewonnene Überstand wurde für die Bestimmung des Immunglobulingehalts mittels ELISA verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **5.7.7 Isolierung von Zellen der MLNs, PLNs und PPs**

Für die Isolierung von Zellen aus MLNs, PLNs und PPs wurden diese aus der zuvor durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getöteten Maus entfernt und in eine Petrischale mit PBS/0,5% BSA überführt. Wie bei der Isolierung von Milzzellen wurden die Lymphknoten mit Hilfe eines Zellsiebes homogenisiert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 450 x g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 10 ml PBS/0,5% BSA bei 450 x g für 5 min gewaschen. Die Zellen wurden schließlich in 1 ml PBS/0,5% BSA resuspendiert und es wurde ein unverdünntes Aliquot gezählt.

### **5.7.8 Isolierung intestinaler Lymphozyten: IELs (intraepitheliale Lymphozyten) und LPLs (Lymphozyten der Lamina Propria)**

Aus dem Dünndarm der Maus wurden intraepitheliale Lymphozyten (IELs) und Lamina Propria Lymphozyten (LPLs) unter Verwendung des von Lefrançois und Lycke beschriebenen Verfahrens [178] isoliert. Die Maus wurde vorerst durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet, der Bauchraum longitudinal geöffnet und der Dünndarm kurz hinter dem Magen

und vor dem Caecum freipräpariert, herausgeschnitten und in PBS/10% FCS gelagert. Der Darm wurde mit PBS/10% FCS gespült, um den enthaltenden Fäzes zu entfernen. Schließlich wurden die PP's mit Hilfe einer feinen Schere entfernt und der Darm wurde longitudinal aufgeschnitten. Für die Isolierung der IELs wurde der Darm nun in ein Zentrifugenröhrchen mit 15 ml HBSS-FCS-EDTA-Medium überführt und für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zentrifugenröhrchen für 10 sec geschüttelt und der Darm wurde in ein Röhrchen mit frischem HBSS-FCS-EDTA-Medium überführt. Dieser Vorgang wurde schließlich noch zwei mal wiederholt. Alle drei IEL-Fraktionen wurden in einem Röhrchen vereinigt, durch Gaze (Polyamid-Siebgewebe von VWR International, Porendurchmesser 60 µm) in ein neues Röhrchen gesiebt und bis zum weiteren Vorgehen auf Eis gelagert. Zur Isolierung der Lymphozyten aus der Lamina Propria wurde der Darm nach der dritten Inkubation in HBSS-FCS-EDTA-Medium kurz in 1x PBS geschwenkt, mit zwei Pinzetten entknotet und in neues Röhrchen mit 10 ml HBSS-FCS-DNase-Collagenase-Medium überführt. Nach einer Inkubation für 45 min bei 37 °C im Wasserbad, wurden die Röhrchen für 10 sec geschüttelt. Der Darm wurde in ein Röhrchen mit frischem HBSS-FCS-DNase-Collagenase-Medium überführt und erneut für 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Auch hier wurden die LPL-Fraktionen in einem Röhrchen vereinigt, durch Gaze gesiebt und auf Eis gelagert. Die gesammelten Fraktionen, mit enthaltenden IELs und LPLs, wurden für 10 min bei 290 x g zentrifugiert und die Zellen wurden in 10 ml RPMI-Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Isolierung der IELs und LPLs erfolgte mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation. Dafür wurden die Zellen in jeweils 4 ml 40%iger Percoll-Lösung resuspendiert und auf 4 ml einer 70%igen Percoll-Lösung geschichtet. Der Percoll-Gradient wurde dann bei RT für 15 min bei 600 x g (ohne Bremse) zentrifugiert. Mononukleäre Zellen geringer Dichte, wie Lymphozyten, sammeln sich an der Grenzschicht, der Interphase. Die Zellen in der Interphase wurden mit einer Pipette vorsichtig abgezogen, einmal mit PBS/0,5% BSA gewaschen, unverdünnt gezählt und in der gewünschten Konzentration in RPMI-Medium aufgenommen.

### **5.8 Arbeiten mit primären murinen Zellen**

#### **5.8.1 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung gefärbter Einzelzellen in Suspension anhand der Lichtstreuungseigenschaften sowie der emittierten Fluoreszenzstrahlung. Beim Durchflusszytometer findet eine gleichzeitige Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie bis zu vier verschiedener Fluoreszenzfarben statt. Zur Analyse wird die Zellsuspension in ein Probenröhrchen gegeben. Die Zellen werden über ein Schlauchsystem mittels Überdruck in den Messbereich eingeführt. Hier

treten sie in eine haarfeine Messküvette ein, die von einem fokussierten Argon-Laser (488 nm, 200 mW) und einem HeNe (633nm) Laser durchstrahlt wird. Die Zellen können den Laser nur einzeln passieren. Die Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden durch Spiegel- und Filtersysteme auf die verschiedenen Photoverstärkerröhren geleitet. Über einen angeschlossenen Computer werden die Messdaten verarbeitet und gespeichert. Für Expressionsanalysen verschiedener Oberflächenmoleküle wurden die isolierten Zellen aus Milz, Blut, mesenterialen bzw. peripheren Lymphknoten, sowie IELs und LPLs mit den unter 5.8.2 aufgeführten fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Es wurden zwischen  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  Zellen in 100  $\mu$ l Färbelösung für 15 min im Dunkeln und auf Eis in 96-Loch-Platten inkubiert. Die Antikörper wurden entsprechend in PBS/0,5% BSA / 1 % RS verdünnt. Nach Inkubation der Zellen in der Färbelösung wurden diese runterzentrifugiert, zwei mal gewaschen, in PBS/0,5% BSA resuspendiert und für die Messung in FACS-Röhrchen (BD, Biosciences) überführt (siehe Abschnitt 5.7.4, letzter Absatz). Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde ein FACSCalibur Durchflusszytometersystem mit Argonlaser (488 nm) verwendet (Fa. BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland). Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms FlowJo 6.0 an einem Apple/Macintosh.

### 5.8.2 Verwendete Antikörper in der FACS-Analyse

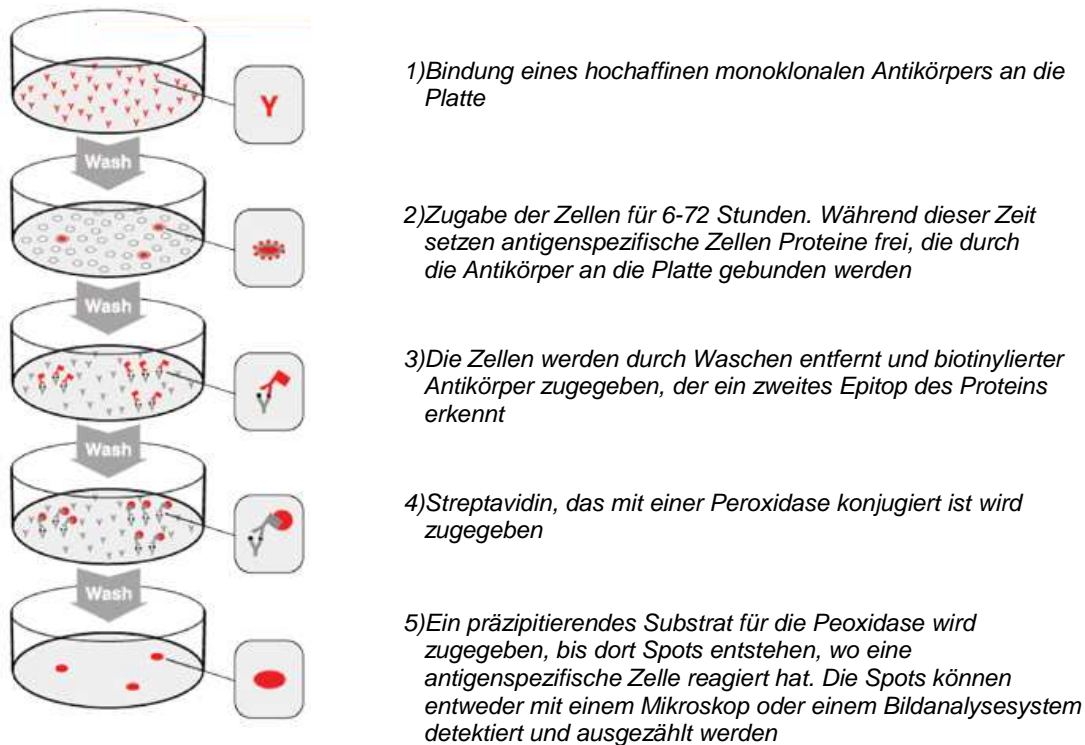
Antikörper	Konjugat	Klon/Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Literaturreferenz
$\beta_1$ -Integrin	FITC	Hamster anti-Ratte (mk)	1:500	BD Pharmingen	[179]
$\beta_7$ -Integrin	PE	Ratte anti-Maus (mk)	1:645	BD Pharmingen	[180]
$\alpha_E$ -Integrin	FITC	Ratte anti-Maus (mk)	1:200	BD Pharmingen	[181]

**Tab. 5.2: Für die FACS-Analyse verwendete Antikörper.** mk – monoklonal, FITC – Fluorescein-Isothiocyanat, PE - Phycoerythrin

### 5.8.3 Elispot-Assay

Die Elispot (enzyme linked immunospot assay)-Technik wurde 1983 ursprünglich zum Nachweis von Antikörper-produzierenden B-Zellen entwickelt [182]. Der Elispot ist ein extrem sensitives Verfahren, um Zellaktivierung auf Einzelzellniveau zu messen. Bei dieser Aktivierung werden u.a. Zytokine oder Immunglobuline freigesetzt. Die von Zellen freigesetzten Proteine werden beim Elispot durch zwei monoklonale Antikörper detektiert, die unterschiedliche Epitope des Proteins erkennen. Der eine der beiden Antikörper ist beim Elispot an eine feste Phase gebunden, so dass es sich vom Prinzip her um einen Festphasen-ELISA handelt. Der Elispot wird insbesondere im Rahmen von Studien eingesetzt, bei denen eine genaue Quantifizierung von zellulären Reaktionen erfasst werden soll. Diese spezifischen zellulären Reaktionen stellen sich in Form kleiner

Farbpunkte, so genannter Spots, mit einem Durchmesser von 20-300  $\mu\text{m}$ , dar, die sich auf dem Boden eines Lochs einer 96-Loch-Platte befinden. Die einzelnen Schritte sind auf Abbildung 5.1 schematisch dargestellt.



**Abb. 5.1: Grafische Darstellung der Elispot-Technik**

In dieser Arbeit wurde die Elispot-Technik für die Quantifizierung von IgA-sezernierenden Lymphozyten etabliert. Bei den hierfür verwendeten Platten handelt es sich um 96-Loch-Filterplatten mit einer hydrophoben Immobilon®-P Membran (sterile Multiscreen HTS-IP Platten mit einer hydrophoben PVDF Membran, Millipore), dessen Porenstruktur die Bindung der Antikörper fördert und somit die Sensitivität dieser Technik steigert.

Für den Nachweis von IgA-sezernierenden Lymphozyten wurden diese Platten als erstes mit einem anti-IgA Antikörper beschichtet. Die Inkubation erfolgte stets ü.N. bei 4 °C. Am nächsten Tag erfolgte die Blockierung der Platten mit RPMI-Medium. Dafür wurden die Platten zweimal mit je 200  $\mu\text{l}$  / Loch gewaschen. Anschließend wurde ein drittes Mal RPMI-Medium auf die Platten gegeben und es erfolgte eine Inkubation für mindestens 2 h bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ . Schließlich erfolgte die Zugabe der IELs bzw. LPLs (siehe Punkt 5.7.8) in der gewünschten Konzentration. Dafür wurde die Blockierlösung von den Platten entfernt und die Zugabe der Zellen erfolgte in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium / Loch (100  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium / Loch wurden vorgelegt und 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension/



Loch wurden dazugegeben). Die Inkubation der Zellen auf den Platten erfolgte für 16–18 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Während dieser Zeit durften die Platten nicht bewegt werden. Am nächsten Tag erfolgte die Entwicklung der Platten. Dafür wurde die Zellsuspension von den Platten entfernt und folgende Waschschrte wurden durchgeführt: 2 x bidest. H<sub>2</sub>O (200 µl / Loch, Inkubation je 3-5 min), 3 x PBS/0,05 % Tween 20 (200 µl / Loch). Schließlich erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers in einem Volumen von 100 µl / Loch. Die entsprechende Verdünnung des Antikörpers erfolgte in PBS/10 % FCS (siehe Tab. 5.3). Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT erfolgten drei Waschschrte mit PBS/0,05 % Tween 20 (200 µl / Loch, Inkubation je 1-2 min) und schließlich die Zugabe von Streptavidin-HRP (100 µl / Loch). Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT. Nachdem die Platten 4 x mit PBS/0,05 % Tween 20 (200 µl / Loch, Inkubation 1-2 min) und 2 x mit 1x PBS (200 µl / Loch) gewaschen wurden, erfolgte die Zugabe der Substratlösung (100 µl / Loch). Die Inkubation erfolgte im Schnitt für 40 min. Durch gründliches Waschen der Platten mit bidest. H<sub>2</sub>O wurde die Reaktion abgestoppt und die Platten wurden ü.N. im Dunkeln getrocknet. Für eine längere Lagerung wurden die Platten in Alufolie gewickelt. Die Auswertung der Elispot-Platten durch automatisiertes Auszählen der gefärbten Spots erfolgte mit Hilfe eines Elispot-Readers der Firma CTL (Cellular Technology Ltd.) sowie der Software *ImmunoSpot image analyzer v3.2*. Tabelle 5.3 gibt eine Übersicht der verwendeten Antikörper und benötigten Lösungen für den Elispot-Assay.

	Verwendeter AK bzw. Lösung	Verwendete Konzentration bzw. Verdünnung	Volumen / Loch einer 96-Loch-Platte	Inkubationszeit	Bezugsquelle
<b>Coating</b>	anti-IgA α chain	5 µg/ml in 1x PBS	100 µl	ü.N. bei 4 °C	eBioscience
<b>Blockierung</b>	RPMI-Medium	-	200 µl	mind. 2 h bei 37°C, 5 % CO <sub>2</sub>	-
<b>Zugabe der Zellen</b>	in RPMI-Medium	gewünschte Zellkonzentration	200 µl	16-18 h bei 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub>	-
<b>Detektion</b>	Detektions-AK: Ziege anti-Maus IgA, biotinyliert	1:2500 in PBS/10% FCS	100 µl	2 h bei RT	Sigma, B2766
	Streptavidin, Peroxidase konjugiert (1 mg/ml)	1:1000 in PBS/10% FCS	100 µl	1 h bei RT	Calbiochem
	Substrat für 1 96-Loch-Platte: 333,3 µl AEC-SL + 10 ml 0,1 M Azetat-Lsg. + 5 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	AEC-SL: 100 mg AEC / 10 ml DMF; Azetat-Lsg.: 148 ml 0,2 M Essigsäure + 352 ml 0,2 M Na-Azetat, ad 1 l mit H <sub>2</sub> O	100 µl	5-60 min	AEC von Sigma

**Tab. 5.3: Übersicht der benötigten Lösungen bzw. Antikörper für die Quantifizierung IgA-sezernierender Lymphozyten mittels Elispot.**

Zur Analyse des Migrationsverhaltens von Lymphozyten wurden *in vivo* Migrationsassays durchgeführt. Für diesen Zweck wurden Lymphozyten aus Milz, MLN, inguinalen, axillären und brachialen Lymphknoten von C57BL/6- und  $\beta_7$ -Integrin defizienten Spendertieren präpariert und mit Tamra (C57BL/6) bzw. CFSE ( $\beta_7$ -Integrin KO) gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden 1:1 gemischt und es erfolgte die i.v. Injektion von  $7,7 \times 10^6$  Zellen in die laterale Schwanzvene von C57BL/6- und MAdCAM-1 defiziente Empfängertiere.

Nach 18 h wurden die Empfängertiere getötet und es wurden Lymphozyten aus Milz, MLN, und PLN isoliert. Um die Verteilung der Kontroll- bzw.  $\beta_7$ -Integrin defizienten Spender-Lymphozyten zu ermitteln, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Dafür wurden, wie schon in Abschnitt 5.8.1 beschrieben, die Zellen mit spezifischen AK gefärbt. Für die Analyse des Migrationsverhaltens von T-Lymphozyten erfolgte die Färbung in diesem Fall mit anti-CD4 AK (Cy5 konjugiert) und anti-CD8 AK (APC-Cy7 konjugiert) (beide AK von Pharmingen). Durch die Bestimmung des relativen Verhältnisses von C57BL/6- und  $\beta_7$ -Integrin defizienten Lymphozyten konnte dann das Migrationsverhalten der T-Lymphozyten in die einzelnen Organe beurteilt werden.

### 5.8.5 Adoptive Transferexperimente

Zur Analyse des Migrationsverhaltens von immunkompetenten T-Lymphozyten wurden adoptive Transferexperimente durchgeführt, in denen TCR (*T cell receptor*)-transgene T-Zellen in C57BL/6- und MAdCAM-1 defiziente Tiere transferiert wurden. Bei den TCR-transgenen T-Zellen handelt es sich um OT-1 (CD8-präsentiert) bzw. OT-2 (CD4-präsentiert) T-Zellen, die das im Kontext von MHC-Klasse I bzw. Klasse II präsentierte Peptid OVA (für OT-1 OVA<sub>257-264</sub>, für OT-2 OVA<sub>323-339</sub>) aus dem Hühnerei-Albumin erkennen. Für diesen Zweck wurden Lymphozyten aus Milz, PLN und MLN von OT-1 bzw. OT-2 Spendertieren präpariert, mit CFSE gefärbt und C57BL/6- und MAdCAM-1 defizienten Empfängertieren i.v. injiziert ( $3,5 \times 10^7$  Zellen / Maus). Einen Tag später wurden die Mäuse i.p. mit 1 mg OVA + 100 µg LPS immunisiert. Drei Tage nach dieser Immunisierung wurden die Empfängertiere getötet und es wurden Lymphozyten aus Milz, MLN, PLN, IEL und LPL isoliert. Mittels FACS-Analyse wurde dann die Anzahl der transferierten OT-1 bzw. OT-2 Zellen in den verschiedenen lymphatischen Organen ermittelt. Folgende AK wurden für die durchflusszytometrische Analyse der TCR-transgenen T-Zellen verwendet: anti-TCR-V $\alpha$ 2 (PE-konjugiert), anti-TCR-V $\beta$ 5.1 (Biotin-konjugiert), anti-CD45.2 (PerCP-Cy5 konjugiert), anti-CD45.1 (Cy5 konjugiert), anti-CD4 (Cy5 konjugiert) und anti-CD8 (APC-Cy7 konjugiert).

### 5.9 ELISA

In dieser Arbeit wurde der ELISA zur Bestimmung von Choleratoxin-spezifischem IgA bzw. IgG aus Serum bzw. Fäzes verwendet (siehe Punkte 5.7.5 – 5.7.6). Die Beschichtung der 96-Loch-Platten (Nunc Maxi Sorp) mit 1 µg/ml Choleratoxin in NaHCO<sub>3</sub> erfolgte in einem Volumen von 50 µl stets ü.N. bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Platten mit 1x PBS gewaschen. Die Blockierung mit 200 µl PBS/10% FCS / Loch erfolgte für 1 h bei 37 °C. Die Verdünnung der zu bestimmenden Proben wurde in PBS/2% FCS/0,05% Tween in 96-Loch-Rundbodenplatten vorgenommen. Nun erfolgte die Zugabe von 50 µl der zu bestimmenden Probe / Loch und eine Inkubation für 90 min bei 37 °C. Nach drei Waschschritten mit je 250 µl PBS/0,05% Tween pro Loch wurden jeweils 50 µl der folgenden Peroxidase-gekoppelten AK (verdünnt in PBS/2% FCS/0,05% Tween) zum Nachweis von IgA bzw. IgG dazugegeben: IgA Pox (aus Ziege, von Caltag), empfohlene Verdünnung: 1:2000; IgG Pox (aus Ratte, von Caltag), empfohlene Verdünnung: 1:4000. Die Inkubation mit den spezifischen AK wurde für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Schließlich wurden die Platten 6x mit je 250 µl PBS/0,05% Tween pro Loch gewaschen und es erfolgte die Zugabe von je 50 µl OPD-Substratlösung pro Loch (Zusammensetzung der Substratlösung: 12 Tabletten OPD (à 5 mg), 6 ml Citratpuffer, 54 ml H<sub>2</sub>O, 60 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Nach 20 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 N HCl pro Loch abgestoppt. Die Auswertung erfolgte an einem ELISA-Reader durch Messen der Absorption bei 492 nm.

### 5.10 Histologische Untersuchungen

#### 5.10.1 Verwendete Antikörper in der Histologie

*FITC-konjugierter Ziege anti-Maus IgA Antikörper von Caltag Laboratories. Der Antikörper wurde für die Färbung von Gefrierschnitten 1:200 verdünnt.*

*Cy5-konjugierter Ratte anti-Maus CD3 Antikörper von Pharmingen. Der Antikörper wurde für die Färbung von Gefrierschnitten 1:80 verdünnt.*

#### 5.10.2 Entnahme und Aufarbeitung von Organen für Parafinschnitte

Für histologische Untersuchungen an Parafinschnitten wurden die entnommenen Organe in Einbettförmchen zwischen zwei Whatmanpapiere gelegt und in 4 % Formaldehyd in Natriumphosphatpuffer bei Raumtemperatur über Nacht fixiert. Die weitere Aufarbeitung sowie die anschließende HE-Färbung erfolgte im Histologischen Labor des HZI (technische Durchführung: Anna Link, Technische Assistentin).

### 5.10.3 Entnahme und Aufarbeitung von Organen für Kryoschnitte

Die entnommenen Organe wurden in Plastikförmchen in Tissue-Tek™ OCT™ (Sakura) eingelegt und auf Trockeneis eingefroren. Die gefrorenen Organe wurden in Alufolie gewickelt, beschriftet und konnten so bei –80°C gelagert werden.

### 5.10.4 Anfertigung von Kryoschnitten und Immunhistochemie

Die Innentemperatur des Kryotoms (Shandon) und des Schneideblocks wurden entsprechend der Empfehlung der Hersteller auf die optimale Temperatur für das zu schneidende Organ eingestellt. Das Organ wurde aufgeblickt und Schnitte mit einer Dicke zwischen 6-8 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Vectabond™-beschichtete Objektträger (Vectabond Laboratories) aufgebracht und bei RT getrocknet. Zur Lagerung wurden die Objektträger in Schachteln verpackt und bei –80°C aufbewahrt.

Für immunhistochemische Färbungen wurden die Schnitte aufgetaut und mit eiskaltem Azeton für 10 min fixiert. Als nächstes wurden die Schnitte 2x für 5 min bei RT in TBST rehydriert. Die Blockierung erfolgte mit TBST/5% RS bei RT 2x für je 10 min. Wurden biotinylierte AK verwendet, erfolgte als nächstes die Blockierung mit Avidin für 15 min, ein Waschschrift mit TBST sowie die Blockierung mit Biotin für 15 min. Schließlich erfolgte die Zugabe der fluoreszenzmarkierten AK. Die Verdünnung der AK wurde in TBST/2,5 % RS vorgenommen, die Inkubation mit der AK-Lösung erfolgte für 60-90 min bei RT. Zur Entfernung der AK wurden die Schnitte 2x mit TBST/1% FCS und 2x mit TBST gewaschen. Wurde ein biotinylierter AK verwendet, erfolgte als nächstes die Zugabe des Sekundär-AKs, ebenfalls verdünnt in TBST/2,5% RS, für 45-60 min bei RT. Für die Sichtbarmachung der Nuklei erfolgte als nächstes die Färbung mit DAPI, verdünnt in TBST, 2x für je 2 min. Schließlich wurden die Schnitte 2x mit TBST gewaschen, bei RT getrocknet und für die Auswertung am Mikroskop in Mowiol oder Fluoroprep (bioMérieux) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgt an einem Zeiss-Mikroskop Axioplan 2 mit Filtern der Firma AHF Analysentechnik und der Kamera Orca ER von Hamamatsu. Das verwendete Programm ist Simple PCI von Hamamatsu.

### 5.10.5 Färbung von lymphatischen Geweben mit Chicago Sky Blue

Für die Visualisierung lymphatischer Gewebe wurde adulten Mäusen i.p. 300 µl einer 1%igen Chicago Sky Blue-Lösung (auch Pontamin Blue genannt, von Sigma) injiziert. Dieser Farbstoff reichert sich innerhalb von lymphatischen Geweben an und führt dazu, dass auch sehr kleine lymphatische Strukturen erkannt werden können. Die Verdünnung des Farbstoffs erfolgte in 1x PBS und die intraperitoneale Injektion wurde durch ausgebildete Tierpfleger am HZI vorgenommen. 16 Tage nach Injektion wurden die Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet und die angefärbten lymphatischen Organe, in

diesem Fall der Dünndarm mit angefärbten PPs, wurden herauspräpariert. Die nun blau-angefärbten PPs konnten für weitere Untersuchungen am Binokular analysiert und ggf. fotografiert werden.

### **5.11 Statistische Auswertungen**

Statistische Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Programms Graphpad Prism. Für den Vergleich von zwei Gruppen diente der Mann Whitney Test. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde der Kruskal-Wallis Test angewandt. Bei einem  $p < 0,05$  wurden Unterschiede in verglichenen Gruppen als signifikant betrachtet.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity*. Cell, 1991. 67(6): p. 1033-6.
2. Sackstein, R., *The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm*. Curr Opin Hematol, 2005. 12(6): p. 444-50.
3. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. 84(7): p. 2068-101.
4. Geng, J.G., et al., *Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140*. Nature, 1990. 343(6260): p. 757-60.
5. Mayadas, T.N., et al., *Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice*. Cell, 1993. 74(3): p. 541-54.
6. Kunkel, E.J. and K. Ley, *Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo*. Circ Res, 1996. 79(6): p. 1196-204.
7. Steeber, D.A., et al., *Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interactions between the L-selectin and ICAM-1 pathways*. J Immunol, 1999. 163(4): p. 2176-86.
8. Arbones, M.L., et al., *Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice*. Immunity, 1994. 1(4): p. 247-60.
9. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. 88(9): p. 3259-87.
10. Rosen, S.D., *Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 129-56.
11. Alon, R., et al., *The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1*. J Cell Biol, 1995. 128(6): p. 1243-53.
12. Johnston, B., T.B. Issekutz, and P. Kubes, *The alpha 4-integrin supports leukocyte rolling and adhesion in chronically inflamed postcapillary venules in vivo*. J Exp Med, 1996. 183(5): p. 1995-2006.
13. Cyster, J.G., *Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs*. Science, 1999. 286(5447): p. 2098-102.
14. Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Structural basis of integrin regulation and signaling*. Annu Rev Immunol, 2007. 25: p. 619-47.
15. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. 76(2): p. 301-14.
16. Dustin, M. and T.A. Springer, *Intercellular adhesion molecules (ICAMs)*. In Extracellular matrix, anchor and adhesion proteins (ed. T. Kreis and R. Vale), Oxford University Press, New York. 1999. 216-220.
17. Norman, M.U., et al., *Overlapping roles of endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 in immune complex-induced leukocyte recruitment in the cremasteric microvasculature*. Am J Pathol, 2003. 163(4): p. 1491-503.
18. Picarella, D., et al., *Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RB<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells*. J Immunol, 1997. 158(5): p. 2099-106.
19. Cunningham, S.A., et al., *JAM2 interacts with alpha4beta1. Facilitation by JAM3*. J Biol Chem, 2002. 277(31): p. 27589-92.
20. Engelhardt, B. and H. Wolburg, *Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?* Eur J Immunol, 2004. 34(11): p. 2955-63.
21. Shaw, S.K., et al., *Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium*. J Immunol, 2001. 167(4): p. 2323-30.



22. Carman, C.V. and T.A. Springer, *A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them*. J Cell Biol, 2004. 167(2): p. 377-88.
23. Feng, D., et al., *Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP*. J Exp Med, 1998. 187(6): p. 903-15.
24. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(9): p. 678-89.
25. Bargatze, R.F., M.A. Jutila, and E.C. Butcher, *Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined*. Immunity, 1995. 3(1): p. 99-108.
26. von Andrian, U.H., *Intravital microscopy of the peripheral lymph node microcirculation in mice*. Microcirculation, 1996. 3(3): p. 287-300.
27. Ley, K. and G.S. Kansas, *Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(5): p. 325-35.
28. Okada, T., et al., *Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches*. J Exp Med, 2002. 196(1): p. 65-75.
29. Warnock, R.A., et al., *Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes*. J Exp Med, 1998. 187(2): p. 205-16.
30. Ebisuno, Y., et al., *Cutting edge: the B cell chemokine CXC chemokine ligand 13/B lymphocyte chemoattractant is expressed in the high endothelial venules of lymph nodes and Peyer's patches and affects B cell trafficking across high endothelial venules*. J Immunol, 2003. 171(4): p. 1642-6.
31. Tang, M.L., et al., *Intrinsic differences in L-selectin expression levels affect T and B lymphocyte subset-specific recirculation pathways*. J Immunol, 1998. 160(10): p. 5113-21.
32. Nakache, M., et al., *The mucosal vascular addressin is a tissue-specific endothelial cell adhesion molecule for circulating lymphocytes*. Nature, 1989. 337(6203): p. 179-81.
33. Berg, E.L., et al., *L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1*. Nature, 1993. 366(6456): p. 695-8.
34. Berlin, C., et al., *Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1*. Cell, 1993. 74(1): p. 185-95.
35. Wagner, N., et al., *Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue*. Nature, 1996. 382(6589): p. 366-70.
36. Streeter, P.R., B.T. Rouse, and E.C. Butcher, *Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes*. J Cell Biol, 1988. 107(5): p. 1853-62.
37. Masopust, D., et al., *Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue*. Science, 2001. 291(5512): p. 2413-7.
38. Reinhardt, R.L., et al., *Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body*. Nature, 2001. 410(6824): p. 101-5.
39. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. 401(6754): p. 708-12.
40. Weninger, W., et al., *Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells*. J Exp Med, 2001. 194(7): p. 953-66.
41. Mazo, I.B., et al., *Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells*. Immunity, 2005. 22(2): p. 259-70.
42. Scimone, M.L., et al., *CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes*. J Exp Med, 2004. 199(8): p. 1113-20.
43. Kaech, S.M., et al., *Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells*. Nat Immunol, 2003. 4(12): p. 1191-8.
44. Wherry, E.J., et al., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets*. Nat Immunol, 2003. 4(3): p. 225-34.



45. Campbell, J.J., et al., *CCR7 expression and memory T cell diversity in humans*. J Immunol, 2001. 166(2): p. 877-84.
46. Kantele, A., et al., *Differential homing commitments of antigen-specific T cells after oral or parenteral immunization in humans*. J Immunol, 1999. 162(9): p. 5173-7.
47. Picker, L.J., et al., *ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells*. Nature, 1991. 349(6312): p. 796-9.
48. Campbell, J.J., et al., *The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells*. Nature, 1999. 400(6746): p. 776-80.
49. Morales, J., et al., *CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(25): p. 14470-5.
50. Reiss, Y., et al., *CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin*. J Exp Med, 2001. 194(10): p. 1541-7.
51. Weninger, W., et al., *Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels*. Immunity, 2000. 12(6): p. 665-76.
52. Homey, B., et al., *CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation*. Nat Med, 2002. 8(2): p. 157-65.
53. Zabel, B.A., et al., *Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis*. J Exp Med, 1999. 190(9): p. 1241-56.
54. Hosoe, N., et al., *Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninflamed intestinal mucosa*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. 286(3): p. G458-66.
55. Wurbel, M.A., et al., *Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes*. Blood, 2001. 98(9): p. 2626-32.
56. Johansson-Lindbom, B., et al., *Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant*. J Exp Med, 2003. 198(6): p. 963-9.
57. Soriano, A., et al., *VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced Colitis in mice*. Lab Invest, 2000. 80(10): p. 1541-51.
58. Papadakis, K.A., et al., *The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system*. J Immunol, 2000. 165(9): p. 5069-76.
59. Pan, J., et al., *A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues*. J Immunol, 2000. 165(6): p. 2943-9.
60. Kunkel, E.J., et al., *CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells*. J Clin Invest, 2003. 111(7): p. 1001-10.
61. Schon, M.P., et al., *Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice*. J Immunol, 1999. 162(11): p. 6641-9.
62. Lefrancois, L., et al., *The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response*. J Exp Med, 1999. 189(10): p. 1631-8.
63. Huehn, J., et al., *Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells*. J Exp Med, 2004. 199(3): p. 303-13.
64. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development*. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 487-513.

65. Cyster, J.G., *Homing of antibody secreting cells*. Immunol Rev, 2003. 194: p. 48-60.
66. Hargreaves, D.C., et al., *A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements*. J Exp Med, 2001. 194(1): p. 45-56.
67. Underhill, G.H., et al., *IgG plasma cells display a unique spectrum of leukocyte adhesion and homing molecules*. Blood, 2002. 99(8): p. 2905-12.
68. McDermott, M.R. and J. Bienenstock, *Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues*. J Immunol, 1979. 122(5): p. 1892-8.
69. Rudzik, O., D.Y. Perey, and J. Bienenstock, *Differential IgA repopulation after transfer of autologous and allogeneic rabbit Peyer's patch cells*. J Immunol, 1975. 114(1 Pt 1): p. 40-4.
70. Farstad, I.N., et al., *Human intestinal B-cell blasts and plasma cells express the mucosal homing receptor integrin alpha 4 beta 7*. Scand J Immunol, 1995. 42(6): p. 662-72.
71. Wilson, E. and E.C. Butcher, *CCL28 controls immunoglobulin (Ig)A plasma cell accumulation in the lactating mammary gland and IgA antibody transfer to the neonate*. J Exp Med, 2004. 200(6): p. 805-9.
72. Hieshima, K., et al., *CC chemokine ligands 25 and 28 play essential roles in intestinal extravasation of IgA antibody-secreting cells*. J Immunol, 2004. 173(6): p. 3668-75.
73. Bowman, E.P., et al., *The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells*. J Exp Med, 2002. 195(2): p. 269-75.
74. Pabst, O., et al., *Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine*. J Exp Med, 2004. 199(3): p. 411-6.
75. Gonzalez, J.C., et al., *Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen and E-selectin ligand by circulating human memory CD4+ T lymphocytes specific for herpes simplex virus type 2*. J Infect Dis, 2005. 191(2): p. 243-54.
76. Campbell, D.J. and E.C. Butcher, *Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues*. J Exp Med, 2002. 195(1): p. 135-41.
77. Iwata, M., et al., *Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells*. Immunity, 2004. 21(4): p. 527-38.
78. Mora, J.R., et al., *Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues*. J Exp Med, 2005. 201(2): p. 303-16.
79. Mora, J.R. and U.H. von Andrian, *T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges*. Trends Immunol, 2006. 27(5): p. 235-43.
80. Streeter, P.R., et al., *A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing*. Nature, 1988. 331(6151): p. 41-6.
81. Viney, J.L., et al., *Mucosal addressin cell adhesion molecule-1: a structural and functional analysis demarcates the integrin binding motif*. J Immunol, 1996. 157(6): p. 2488-97.
82. Oshima, T., et al., *Regulation and distribution of MAdCAM-1 in endothelial cells in vitro*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. 281(4): p. C1096-105.
83. Sikorski, E.E., et al., *The Peyer's patch high endothelial receptor for lymphocytes, the mucosal vascular addressin, is induced on a murine endothelial cell line by tumor necrosis factor-alpha and IL-1*. J Immunol, 1993. 151(10): p. 5239-50.
84. Connor, E.M., et al., *Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in acute and chronic inflammation*. J Leukoc Biol, 1999. 65(3): p. 349-55.

85. Fong, S., et al., *Mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1). Its binding motif for alpha 4 beta 7 and role in experimental Colitis*. Immunol Res, 1997. 16(3): p. 299-311.
86. Shigematsu, T., et al., *MAdCAM mediates lymphocyte-endothelial cell adhesion in a murine model of chronic Colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. 281(5): p. G1309-15.
87. Farkas, S., et al., *Blocking MAdCAM-1 in vivo reduces leukocyte extravasation and reverses chronic inflammation in experimental Colitis*. Int J Colorectal Dis, 2006. 21(1): p. 71-8.
88. Kato, S., et al., *Amelioration of murine experimental Colitis by inhibition of mucosal addressin cell adhesion molecule-1*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. 295(1): p. 183-9.
89. Stopfer, P., et al., *Blocking lymphotoxin-beta receptor activation diminishes inflammation via reduced mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) expression and leucocyte margination in chronic DSS-induced Colitis*. Clin Exp Immunol, 2004. 136(1): p. 21-9.
90. Grant, A.J., et al., *MAdCAM-1 expressed in chronic inflammatory liver disease supports mucosal lymphocyte adhesion to hepatic endothelium (MAdCAM-1 in chronic inflammatory liver disease)*. Hepatology, 2001. 33(5): p. 1065-72.
91. Eksteen, B., et al., *Lymphocyte homing in the pathogenesis of extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease*. Clin Med, 2004. 4(2): p. 173-80.
92. Yang, X.D., et al., *Involvement of beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in the development of diabetes in obese diabetic mice*. Diabetes, 1997. 46(10): p. 1542-7.
93. Etzioni, A., *Integrins--the glue of life*. Lancet, 1999. 353(9150): p. 341-3.
94. Kinashi, T., *Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(7): p. 546-59.
95. Pierschbacher, M.D. and E. Ruoslahti, *Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule*. Nature, 1984. 309(5963): p. 30-3.
96. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. 110(6): p. 673-87.
97. Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti, *Integrin signaling*. Science, 1999. 285(5430): p. 1028-32.
98. Dustin, M.L. and T.A. Springer, *T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1*. Nature, 1989. 341(6243): p. 619-24.
99. Bazzoni, G. and M.E. Hemler, *Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized?* Trends Biochem Sci, 1998. 23(1): p. 30-4.
100. Takagi, J. and T.A. Springer, *Integrin activation and structural rearrangement*. Immunol Rev, 2002. 186: p. 141-63.
101. Shimaoka, M., et al., *Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation*. Cell, 2003. 112(1): p. 99-111.
102. Hughes, P.E., et al., *Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling*. J Biol Chem, 1996. 271(12): p. 6571-4.
103. Constantin, G., et al., *Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow*. Immunity, 2000. 13(6): p. 759-69.
104. Laudanna, C., J.J. Campbell, and E.C. Butcher, *Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins*. Science, 1996. 271(5251): p. 981-3.
105. Cherry, L.K., et al., *RhoH is required to maintain the integrin LFA-1 in a nonadhesive state on lymphocytes*. Nat Immunol, 2004. 5(9): p. 961-7.

106. Lucas, J.A., et al., *The role of Tec family kinases in T cell development and function*. Immunol Rev, 2003. 191: p. 119-38.
107. Wary, K.K., et al., *The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression*. Cell, 1996. 87(4): p. 733-43.
108. Schaller, M.D., et al., *Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains*. J Cell Biol, 1995. 130(5): p. 1181-7.
109. Schaller, M.D., et al., *Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src*. Mol Cell Biol, 1994. 14(3): p. 1680-8.
110. Chen, H.C., et al., *Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 1996. 271(42): p. 26329-34.
111. Vuori, K. and E. Ruoslahti, *Association of insulin receptor substrate-1 with integrins*. Science, 1994. 266(5190): p. 1576-8.
112. Cybulsky, A.V., A.J. McTavish, and M.D. Cyr, *Extracellular matrix modulates epidermal growth factor receptor activation in rat glomerular epithelial cells*. J Clin Invest, 1994. 94(1): p. 68-78.
113. Treisman, R., *Regulation of transcription by MAP kinase cascades*. Curr Opin Cell Biol, 1996. 8(2): p. 205-15.
114. Crowe, D.T., et al., *Regulation of the avidity of integrin alpha 4 beta 7 by the beta 7 cytoplasmic domain*. J Biol Chem, 1994. 269(20): p. 14411-8.
115. Diamond, M.S. and T.A. Springer, *The dynamic regulation of integrin adhesiveness*. Curr Biol, 1994. 4(6): p. 506-17.
116. O'Toole, T.E., J. Ylanne, and B.M. Culley, *Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmic domain*. J Biol Chem, 1995. 270(15): p. 8553-8.
117. Williams, M.J., et al., *The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains*. Trends Cell Biol, 1994. 4(4): p. 109-12.
118. Hibbs, M.L., et al., *The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 beta subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site*. J Exp Med, 1991. 174(5): p. 1227-38.
119. Liddington, R.C. and M.H. Ginsberg, *Integrin activation takes shape*. J Cell Biol, 2002. 158(5): p. 833-9.
120. Horwitz, A., et al., *Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage*. Nature, 1986. 320(6062): p. 531-3.
121. Calderwood, D.A., *Integrin activation*. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 5): p. 657-66.
122. Vinogradova, O., et al., *A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face*. Cell, 2002. 110(5): p. 587-97.
123. Ginsberg, M.H., A. Partridge, and S.J. Shattil, *Integrin regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2005. 17(5): p. 509-16.
124. Ohta, Y., et al., *The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(5): p. 2122-8.
125. Loo, D.T., S.B. Kanner, and A. Aruffo, *Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction*. J Biol Chem, 1998. 273(36): p. 23304-12.
126. Liliental, J. and D.D. Chang, *Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit*. J Biol Chem, 1998. 273(4): p. 2379-83.
127. Rietzler, M., et al., *The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of beta7-integrins*. J Biol Chem, 1998. 273(42): p. 27459-66.



128. Rojiani, M.V., et al., *In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits.* Biochemistry, 1991. 30(41): p. 9859-66.
129. Parker, C.M., et al., *A family of beta 7 integrins on human mucosal lymphocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(5): p. 1924-8.
130. Schweighoffer, T., et al., *Selective expression of integrin alpha 4 beta 7 on a subset of human CD4+ memory T cells with Hallmarks of gut-tropism.* J Immunol, 1993. 151(2): p. 717-29.
131. Murai, M., et al., *Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction.* Nat Immunol, 2003. 4(2): p. 154-60.
132. Hesterberg, P.E., et al., *Rapid resolution of chronic Colitis in the cotton-top tamarin with an antibody to a gut-homing integrin alpha 4 beta 7.* Gastroenterology, 1996. 111(5): p. 1373-80.
133. Ghosh, S., et al., *Natalizumab for active Crohn's disease.* N Engl J Med, 2003. 348(1): p. 24-32.
134. Kellersmann, R., et al., *Monoclonal antibody against beta7 integrins, but not beta7 deficiency, attenuates intestinal allograft rejection in mice.* Transplantation, 2002. 74(9): p. 1327-34.
135. Waldman, E., et al., *Absence of beta7 integrin results in less graft-versus-host disease because of decreased homing of alloreactive T cells to intestine.* Blood, 2006. 107(4): p. 1703-11.
136. Hibbs, M.L., et al., *Regulation of adhesion of ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit.* Science, 1991. 251(5001): p. 1611-3.
137. Masumoto, A. and M.E. Hemler, *Multiple activation states of VLA-4. Mechanistic differences between adhesion to CS1/fibronectin and to vascular cell adhesion molecule-1.* J Biol Chem, 1993. 268(1): p. 228-34.
138. Krissansen, G.W., et al., *A pseudosymmetric cell adhesion regulatory domain in the beta7 tail of the integrin alpha4beta7 that interacts with focal adhesion kinase and src.* Eur J Immunol, 2006. 36(8): p. 2203-14.
139. Rieke, S., *Analyse der Organogenese der Peyer'schen Platten in beta7-Integrin defizienten und MAdCAM-1 defizienten Mäusen.* Diplomarbeit, Universität Braunschweig, 2004.
140. Neffgen, C., *Mutagenese der zytoplasmatischen Domäne des b7-Integrin-Gens in embryonalen Stammzellen der Maus.* Diplomarbeit, Universität Köln, 2002.
141. Kochut, A., *Generierung und Analyse von Mausmutanten mit gezielten Veränderungen im beta7-Integrin Gen.* Diplomarbeit, Universität Braunschweig, 2004.
142. Singh, G. and J. Lykke-Andersen, *New insights into the formation of active nonsense-mediated decay complexes.* Trends Biochem Sci, 2003. 28(9): p. 464-6.
143. Holbrook, J.A., et al., *Nonsense-mediated decay approaches the clinic.* Nat Genet, 2004. 36(8): p. 801-8.
144. Torres, R.u. Kühn., R., *Laboratory protocols for conditional gene targeting.* 1997: Oxford University Press.
145. Kolb, A.F., *Genome engineering using site-specific recombinases.* Cloning Stem Cells, 2002. 4(1): p. 65-80.
146. Akopian, A. and W. Marshall Stark, *Site-specific DNA recombinases as instruments for genomic surgery.* Adv Genet, 2005. 55: p. 1-23.
147. van der Weyden, L., D.J. Adams, and A. Bradley, *Tools for targeted manipulation of the mouse genome.* Physiol Genomics, 2002. 11(3): p. 133-64.

148. Youngman, K.R., et al., *Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response*. J Immunol, 2002. 168(5): p. 2173-81.
149. Svensson, M., et al., *CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa*. J Clin Invest, 2002. 110(8): p. 1113-21.
150. Johansson-Lindbom, B., et al., *Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing*. J Exp Med, 2005. 202(8): p. 1063-73.
151. Hogquist, K.A., et al., *T cell receptor antagonist peptides induce positive selection*. Cell, 1994. 76(1): p. 17-27.
152. Frischmeyer, P.A. and H.C. Dietz, *Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease*. Hum Mol Genet, 1999. 8(10): p. 1893-900.
153. Lewis, B.P., R.E. Green, and S.E. Brenner, *Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(1): p. 189-92.
154. Isken, O. and L.E. Maquat, *Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function*. Genes Dev, 2007. 21(15): p. 1833-56.
155. Tapley, P., et al., *Integrins isolated from Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts*. Oncogene, 1989. 4(3): p. 325-33.
156. Reszka, A.A., Y. Hayashi, and A.F. Horwitz, *Identification of amino acid sequences in the integrin beta 1 cytoplasmic domain implicated in cytoskeletal association*. J Cell Biol, 1992. 117(6): p. 1321-30.
157. Hughes, P.E., et al., *The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity*. J Biol Chem, 1995. 270(21): p. 12411-7.
158. Maquat, L.E., *Defects in RNA splicing and the consequence of shortened translational reading frames*. Am J Hum Genet, 1996. 59(2): p. 279-86.
159. Haffner, K., et al., *A small in-frame deletion within the protease domain of muscle-specific calpain, p94 causes early-onset limb-girdle muscular dystrophy 2A*. Hum Mutat, 1998. Suppl 1: p. S298-300.
160. Goldberg, A.L., *Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins*. Nature, 2003. 426(6968): p. 895-9.
161. Mowat, A.M., *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(4): p. 331-41.
162. Wittig, B.M. and M. Zeitz, *The gut as an organ of immunology*. Int J Colorectal Dis, 2003. 18(3): p. 181-7.
163. Park, E.J., et al., *Aberrant activation of integrin alpha4beta7 suppresses lymphocyte migration to the gut*. J Clin Invest, 2007. 117(9): p. 2526-38.
164. Tedder, T.F., D.A. Steeber, and P. Pizcueta, *L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites*. J Exp Med, 1995. 181(6): p. 2259-64.
165. Wagner, N., et al., *L-selectin and beta7 integrin synergistically mediate lymphocyte migration to mesenteric lymph nodes*. Eur J Immunol, 1998. 28(11): p. 3832-9.
166. Berlin-Rufenach, C., et al., *Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice*. J Exp Med, 1999. 189(9): p. 1467-78.
167. Calame, K.L., *Plasma cells: finding new light at the end of B cell development*. Nat Immunol, 2001. 2(12): p. 1103-8.
168. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, *Plasma-cell homing*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(10): p. 822-9.
169. Hwang, S.T., et al., *GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates beta 2 integrins on naive peripheral lymphocytes*. J Exp Med, 1996. 184(4): p. 1343-8.

170. Kraal, G., et al., *Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen*. Am J Pathol, 1995. 147(3): p. 763-71.
171. Grayson, M.H., et al., *Intravital microscopy comparing T lymphocyte trafficking to the spleen and the mesenteric lymph node*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 284(6): p. H2213-26.
172. Okada, Y., et al., *Propionibacterium freudenreichii component 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) attenuates dextran sodium sulphate induced Colitis by modulation of bacterial flora and lymphocyte homing*. Gut, 2006. 55(5): p. 681-8.
173. Salmi, M. and S. Jalkanen, *Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment*. Immunol Rev, 2005. 206: p. 100-13.
174. Apostolaki, M.e.a., *Role of  $\beta 7$  integrin and the chemokine/chemokine receptor pair CCL25/CCR9 in modeled TNF-dependent Crohn's disease*. Gastroenterology, 2008.
175. Müller, W., R. Kühn, and K. Rajewsky, *Major histocompatibility complex class II hyperexpression on B cells in interleukin 4-transgenic mice does not lead to B cell proliferation and hypergammaglobulinemia*. Eur J Immunol, 1991. 21(4): p. 921-5.
176. Kühn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. 75(2): p. 263-74.
177. Sambrook, J.u.M., T., *Molecular cloning-a laboratory manual, 2nd edition*. 1989.
178. Leo Lefrancois, N.L., *Isolation of small intestinal intraepithelial lymphocytes, Peyer's Patch and Lamina Propria cells*. Current Protocols in Immunology., 1996. Unit 3.19.
179. Mendrick, D.L. and D.M. Kelly, *Temporal expression of VLA-2 and modulation of its ligand specificity by rat glomerular epithelial cells in vitro*. Lab Invest, 1993. 69(6): p. 690-702.
180. Andrew, D.P., et al., *Distinct but overlapping epitopes are involved in alpha 4 beta 7-mediated adhesion to vascular cell adhesion molecule-1, mucosal addressin-1, fibronectin, and lymphocyte aggregation*. J Immunol, 1994. 153(9): p. 3847-61.
181. Kilshaw, P.J. and K.C. Baker, *A unique surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the mouse*. Immunol Lett, 1988. 18(2): p. 149-54.
182. Czerkinsky, C.C., et al., *A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells*. J Immunol Methods, 1983. 65(1-2): p. 109-21.
183. Marelli-Berg, F.M., et al., *The highway code of T cell trafficking*. J Pathol, 2008. 214(2): p. 179-89.
184. Bruce Alberts, D.B., Julian Lewis, *Molecular biology of the cell, 4<sup>th</sup> edition*, Taylor & Francis. 2002.



## 7 Anhang

### 7.1 Primersequenzen

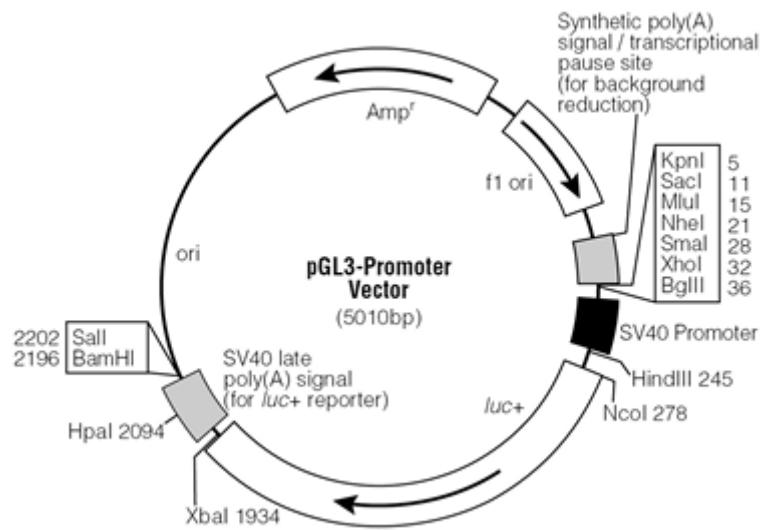
Alle nachfolgend aufgeführten Primersequenzen sind in der Orientierung 5' - 3' angegeben.

Primerbezeichnung	Sequenz	PCR
Neo2sense <sup>1</sup>	GGG GCC AGG CTC AAG GCG AGC ATG C	PCR zum Screenen der ES-Zellklone (s. 5.6.12.1)
Psgantisense <sup>2</sup>	GGG TGG GGA AGC TTT TTC TCC AAA GG	PCR zum Screenen der ES-Zellklone (s. 5.6.12.1)
NeoDelsense <sup>3</sup>	ACA CAT AAC CAG CTC TAA AGC TTC C	PCR zum Nachweis der Deletion des Neomycin-Resistenzgens (s. 5.6.12.2)
NeoDelantisense <sup>4</sup>	CAG TAA GGA AAA CTA TCA GGC TCT C	PCR zum Nachweis der Deletion des Neomycin-Resistenzgens (s. 5.6.12.2)
Agelsense <sup>5</sup>	GGG ACC GGT CCC CTG GCA GCC	PCR zur Genotypisierung der $\Delta 61$ -Mäuse (s. 5.6.12.3)
AatIIantisense <sup>6</sup>	GGG GAC GTC ACC ATG AAA GCC CAG CC	PCR zur Genotypisierung der $\Delta 61$ -Mäuse (s. 5.6.12.3)
Ex15sense <sup>7</sup>	GGC CTC GTG GGG CAG GTA GT	PCR zur Amplifizierung von Exon 15 des $\beta_7$ -Integrin Gens (s. 5.6.12.4)
Ex15antisense <sup>8</sup>	GGC CTA CAT AGT CTG GTT TGT	PCR zur Amplifizierung von Exon 15 des $\beta_7$ -Integrin Gens (s. 5.6.12.4)
18Hsense <sup>9</sup>	GGG TCT GCT GCA AGC CGT GGG GTC C	PCR zur Amplifizierung der Southern-Sonde aus pBsKs18H (s. 5.6.12.5)
18Hantisense <sup>10</sup>	GGG GAA TCC CTC CCT GCC ACT CG	PCR zur Amplifizierung der Southern-Sonde aus pBsKs18H (s. 5.6.12.5)
Agelsense <sup>11</sup>	GGG ACC GGT CCC CTG GCA GCC	PCR zur Einführung von Schnittstellen in den Targeting Vektor $\Delta 61$ (s. 5.6.12.6)
NdeI/AfIIIantisense <sup>12</sup>	GGG TGG GAC TAG GGC TGG TTC TGG CT	PCR zur Einführung von Schnittstellen in den Targeting Vektor $\Delta 61$ (s. 5.6.12.6)
AfIII/NdeIsense <sup>13</sup>	GGG CCG TCG GTC GTA GAT TTC CAC AG	PCR zur Einführung von Schnittstellen in den Targeting Vektor $\Delta 61$ (s. 5.6.12.6)
AatIIantisense <sup>14</sup>	GGG GAC GTC ACC ATG AAA GCC CAG CC	PCR zur Einführung von Schnittstellen in den Targeting Vektor $\Delta 61$ (s. 5.6.12.6)
Poly(A)NdeIsense <sup>15</sup>	GGG CAT ATG CAG ACA TGA TAA GAT AC	PCR zur Amplifizierung des SV40 poly(A) Signals aus pGL3-Promotor (s. 5.6.12.7)

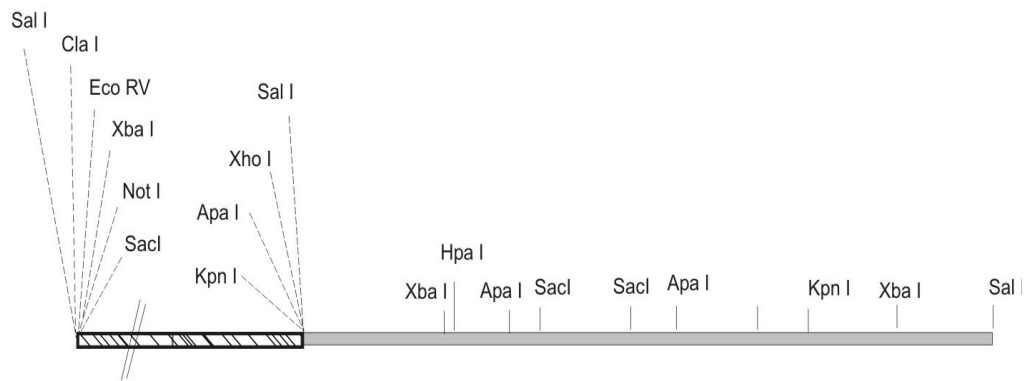
Poly(A)AflIIIantisense <sup>16</sup>	GGG CTT AAG TAC CAC ATT TGT AGA GG	PCR zur Amplifizierung des SV40 poly(A) Signals aus pGL3-Promotor (s. 5.6.12.7)
--------------------------------------	---------------------------------------	--

## 7.2 Matrizen für PCRs

### 7.2.1 pGL3-Promotor für die Amplifizierung des SV40 *late* poly(A) Signals



### 7.2.2 pBsKs18H-Plasmid für die Amplifizierung der externen Southern Blot Sonde



### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	<i>antigen presenting cell</i> – Antigen präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ASC	<i>antibody secreting cell</i> - Antikörper sezernierende Zelle
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> – Rinderserumalbumin
CAM	<i>cell adhesion molecule</i> – Zelladhäsionsmolekül
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CT	Choleratoxin
d	<i>day</i> - Tag
DC	<i>dendritic cell</i> – Dendritische Zelle
$\Delta/\Delta$	homozygot
$\Delta/\text{wt}$	heterozygot
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	<i>extracellular matrix</i> – extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Zellen	embryonale Feeder Zellen
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Elispot	<i>enzyme-linked immunospot assay</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> – fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRT	<i>flp recognition target</i> – Flp Rekombinase
	Erkennungssequenz
g	Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i> – darmassoziiertes lymphatisches Gewebe
h	<i>hour</i> – Stunde
HBSS	<i>Hank`s buffered salt solution</i>
HEV	<i>high endothelial venule</i> – Venole mit hohem Endothel
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>

ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IEL	intraepithelialer Lymphozyt
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasenpaar
KO	<i>Knockout</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LN	<i>lymph node</i> - Lymphknoten
LP	Lamina Propria
LPL	Lamina Propria Lymphozyt
LPS	Lipopolysaccharid
MAdCAM-1	<i>mucosal adressin cell adhesion molecule-1</i>
min	Minute
mk	monoklonal
MLN	mesenterialer Lymphknoten
NEO	Neomycin
NMD	<i>nonsense mediated RNA-decay</i>
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PLN	peripherer Lymphknoten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Peyer`sche Platte
PTC	<i>premature translation termination codon</i> – vorzeitiges Translationsterminationscodon
RS	Rattenserum
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> - Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TCR	<i>T cell receptor</i> – T-Zell Rezeptor
U	<i>unit</i> - Einheit
ü.N.	über Nacht
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

# Danksagung

Mein erster herzlicher Dank geht an Herrn Dr. Werner Müller für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die zahlreichen fachlichen wie nicht fachlichen Gespräche. Des Weiteren bedanke ich mich, dass es mir ermöglicht wurde, an interessanten Tagungen und Seminaren während meiner Promotion teilzunehmen zu können.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wehland danke ich für die Betreuung des Promotionsverfahrens sowie der Übernahme des Hauptreferats. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel für die Übernahme des Korreferats sowie Herrn Prof. Dr. Martin Korte für die Bereitschaft als Prüfer zur Verfügung zu stehen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Angela Schippers, die nicht nur durch Ihre fachliche Kompetenz zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ich danke Dir für Deine moralische Unterstützung während der gesamten Promotionszeit und die konstruktive Kritik, die mich immer ein Stück weiter brachte.

Auch bei Herrn Dr. Martin Hafner möchte ich mich für die große Hilfsbereitschaft bei Problemen aller Art bedanken.

Für die Kooperation bei der Analyse der MAdCAM-1 Mausmutante danke ich Herrn Dr. Oliver Pabst sowie den Mitarbeitern seines Labors an der MHH.

Meiner gesamten Arbeitsgruppe gebührt ebenfalls ein großer Dank. Durch eure Unterstützung und dem familiären Arbeitsklima konnte ich so manches 'Tief' bewältigen! Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Maria Ebel, Anke Samuels, Sieglinde Keilholz-Gast, Mirjam Schwarzkopf und Heike Petrat für ihre Hilfestellungen bei Maus-Genotypisierungen sowie zahlreichen Experimenten.

Auch den Mädels (und Jungs) vom Tierhaus danke ich für die Betreuung meiner vielen Mauszuchten. Ein besonderer Dank geht hierbei an Kirsten Kleemann und Susi Etzrodt als meine 'Mäuseverwalterinnen'.

Natürlich möchte ich auch an dieser Stelle einen großen Dank an meine Mit-Doktoranden aussprechen. Die Zeit mit Euch werde ich nie vergessen!

Danken möchte ich auch allen meinen Freunden, besonders Nine und Dörte für wundervolle Freundschaften. Ihr habt wesentlich dazu beigetragen, dass ein Leben neben der Doktorarbeit lebenswert sein kann.

Für ihre Liebe und immerwährende Unterstützung danke ich meinen Eltern sowie meiner Familie. Erst Durch Deine Hilfe liebe Mama wurden mir viele Dinge in meinem Leben ermöglicht.

René, Dir danke ich für alles. Ohne Dich wäre ich nur ein halber Mensch.